

Université de Montréal

Implication de l'acide urique dans l'atteinte du système nerveux central d'un modèle murin
de choc hémorragique réanimé

par
Sydnée L'Écuyer

Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences en Sciences Biomédicales, Médecine
expérimentale

Décembre, 2019

© Sydnée L'Écuyer, 2019

Université de Montréal
Unité académique : Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé
**Implication de l'acide urique dans l'atteinte du système nerveux central d'un modèle murin
de choc hémorragique réanimé**

Présenté par
Sydnée L'Écuyer

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Christopher Rose, PhD
Président-rapporteur

Emmanuel Charbonney, MD, PhD
Directeur de recherche

Jean-François Cailhier, MD, PhD
Membre du jury

Résumé

Les traumatismes graves sont une cause principale d'hospitalisations et peuvent induire des handicaps physiques et psychologiques. Dans ce travail, nous nous intéressons au choc hémorragique (CH), défini par une perte sanguine de plus de 30% menant à une ischémie systémique causant de la mort cellulaire et la libération de médiateurs circulants. Parmi ces médiateurs, notre groupe a déjà démontré l'augmentation en circulation de l'acide urique (AU) après le CH et son rôle dans l'atteinte d'organes ; un effet qui est prévenu par l'utilisation d'une uricase, qui métabolise l'AU circulant. Notre objectif actuel est de démontrer le rôle de l'AU dans l'altération du système nerveux central. Pour ce faire nous utilisons un modèle murin de CH reperfusé avec 3 groupes expérimentaux : SHAM (contrôle), CH et CH+U (uricase IP au moment de la reperfusion). Nos résultats démontrent que l'altération de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (augmentation significative de la perméabilité à la fluorescéine de sodium (NaF)) et de l'expression de ICAM-1 après le CH peut être prévenu par l'administration d'uricase. Les résultats sont les mêmes pour la mesure de la neuroinflammation (activité de la myéloperoxydase (neutrophiles) ainsi que astrocytes et microglie activés) et de l'apoptose/dégénérescence neuronale (caspase-3, coloration TUNEL et fluorojade). En conséquence à l'atteinte neuroinflammatoire et apoptotiques, nous observons une augmentation significative des comportements anxieux après le CH, détectés par le test de nage forcée, le labyrinthe en croix surélevé et l'interaction sociale, et qui sont prévenus par le traitement avec uricase. En conclusion, ce projet permet de confirmer que l'AU joue un rôle important dans l'atteinte cérébrale et l'altération des comportements, après le CH reperfusé.

Mots clés

Choc hémorragique, acide urique, système limbique, barrière hématoencéphalique, neuroinflammation, anxiété.

Abstract

Polytrauma is one of the main causes of hospitalisations and can lead to physical and psychological handicaps. This work focuses on hemorrhagic shock (HS), defined by a blood-loss of at least 30%, leading to systemic ischemia, cell death and the release of various mediators in circulation. The importance of one of these mediators, uric acid (UA), in multiple organ failure after HS and the improvement by the use of an uricase, which can destroy UA, was already demonstrated by our lab. Our objective is to illustrate the implication of UA in central nervous system alterations after HS. To reach this goal, we use a murine model which is assigned to one of our 3 experimental groups: SHAM (control), HS and HS+U (IP injection of uricase at reperfusion). Our results show an altered blood-brain barrier permeability (significant infiltration of NaF in the brain after HS), an increased expression of ICAM-1 after HS and a prevention of both these results by uricase treatment. The same results are observed for neuroinflammation (myeloperoxidase activity (neutrophils), astrocytes and microglia) and for neuronal apoptosis/degeneration (caspase-3, TUNEL staining and FluoroJade staining). Furthermore, anxiety is increased after HS compared to SHAM but prevented with uricase treatment. The tests used to reach this conclusion are the elevated plus maze, the forced swim test and social interaction. In conclusion, this project confirms the central role of UA in brain lesions and subsequent behavioral alterations after resuscitated HS.

Key words

Haemorrhagic shock, uric acid, limbic system, blood-brain barrier, neuroinflammation, anxiety.

Table des matières

Liste des figures	8
Liste des abréviations	9
Remerciements	11
1 Introduction	12
1.1 Le choc hémorragique.....	13
<i>1.1.1 Description générale.....</i>	<i>13</i>
<i>1.1.2 Traitements</i>	<i>15</i>
<i>1.1.3 Complications causées par les lésions de reperfusion.....</i>	<i>17</i>
1.2 Notre alarmine d'intérêt : l'acide urique.....	19
<i>1.2.1 Définition</i>	<i>19</i>
<i>1.2.2 Métabolisme</i>	<i>20</i>
<i>1.2.3 Rôle dans l'organisme</i>	<i>20</i>
1.3 Le système limbique.....	22
<i>1.3.1 Implication du système limbique dans l'anxiété et la dépression</i>	<i>23</i>
<i>1.3.2 Principales lésions du SNC : Neuroinflammation et apoptose</i>	<i>24</i>
1.4 La barrière hématoencéphalique.....	27
<i>1.4.1 Structure et fonction.....</i>	<i>28</i>
<i>1.4.2 Bris de l'exclusivité immunitaire du SNC secondaire à l'inflammation.....</i>	<i>29</i>
<i>1.4.3 Altération de la perméabilité de la BHE par l'ischémie et l'acide urique.....</i>	<i>30</i>
1.5 Hypothèse et objectifs	31
2 Matériel et Méthodes	32
2.1 Modèle animal	32
2.2 Procédures chirurgicales	32
2.3 Récupération des échantillons	33
2.4 Dosage de la concentration d'acide urique plasmatique et dans le cerveau	35
2.5 Mesure de l'altération de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique.....	35
<i>2.5.1 Pénétration de la fluorescéine de sodium au niveau du parenchyme cérébral.....</i>	<i>35</i>

2.5.2	Western Blot pour expression de ICAM-1.....	36
2.6	Mesure de la neuroinflammation	37
2.6.1	Dosage de l'activité de la myéloperoxidase	37
2.6.2	Dosage de l'activation des cellules inflammatoires cérébrales : astrocytes et microglie	38
2.7	Mesure de l'apoptose dans le cerveau	40
2.7.1	Activité de la caspase-3	40
2.7.2	Coloration TUNEL.....	41
2.7.3	Immunofluorescence	41
2.8	Tests de comportement.....	42
2.8.1	Test de labyrinthe en croix surélevé	42
2.8.2	Test de nage forcée.....	42
2.8.3	Test d'interaction sociale	42
2.9	Dosage de la corticostérone plasmatique	43
2.10	Statistiques	43
3	Résultats.....	44
3.1	Données hémodynamiques	44
3.2	Circulation d'AU et passage au cerveau.....	45
3.3	Altération de la perméabilité de la BHE.....	46
3.3.1	Fluorescéine de sodium	46
3.3.2	Expression ICAM-1 et infiltration par neutrophiles après le CH.....	47
3.3.3	Expression ICAM-1 et infiltration par neutrophiles suite à l'injection d'AU exogène en l'absence de choc hémorragique	48
3.4	Neuroinflammation.....	50
3.4.1	Activation de l'astroglie (GFAP) et de la microglie (Iba1)	50
3.4.2	Libération d'IL-1 β dans le cerveau après CH	52
3.5	Apoptose dans le cerveau	53
3.5.1	Activité de la caspase-3 et coloration TUNEL.....	53
3.5.2	Coloration au Fluor Jade	54
3.6	Tests de comportements.....	55
3.6.1	Test de labyrinthe en croix surélevé	55
3.6.2	Test de nage forcée.....	56

3.6.3	<i>Test d'interaction sociale</i>	57
3.7	Analyse de la corticostérone plasmatique	57
4	Discussion	58
4.1	Données hémodynamiques	58
4.2	Validité du traitement avec l'uricase	58
4.3	Atteinte structurale cérébrale après le choc hémorragique	59
4.3.1	<i>Atteinte de la barrière hématoencéphalique</i>	60
4.3.2	<i>Atteinte neuroinflammatoire du parenchyme cérébral</i>	62
4.3.3	<i>Effet de l'acide urique sur l'apoptose dans le cerveau</i>	64
4.4	Développement de comportements anxieux après le choc hémorragique	65
4.4.1	<i>Atteinte comportementale : interprétation des tests utilisés</i>	67
4.4.2	<i>Circulation de corticostérone</i>	69
4.5	Conclusions et perspectives d'expériences futures	71
5	Références bibliographiques	72

Liste des figures

Figure 1. Structure de la barrière hématoencéphalique (BHE).	p. 28
Figure 2. Procédures expérimentales.	p. 34
Figure 3. Données hémodynamiques et pourcentage de volume sanguin utilisé pour la reperfusion.	p. 44
Figure 4. L'acide urique augmente au niveau plasmatique et cérébral après le choc hémorragique.	p. 45
Figure 5. Le traitement avec l'uricase prévient une augmentation de la perméabilité à la fluorescéine de sodium après le choc hémorragique.	p. 46
Figure 6. Le traitement avec l'uricase prévient une augmentation de l'expression de ICAM-1.	p. 47
Figure 7. L'uricase prévient l'infiltration par les neutrophiles au niveau cérébral.	p. 47
Figure 8. L'acide urique exogène augmente l'expression de ICAM-1.	p. 48
Figure 9. L'acide urique exogène augmente l'infiltration par le neutrophiles.	p. 49
Figure 10. L'uricase prévient l'activation des astrocytes.	p. 50
Figure 11. L'uricase prévient l'activation de la microglie.	p. 51
Figure 12. L'uricase prévient une augmentation de l'IL-1 β au niveau cérébral.	p. 52
Figure 13. L'uricase prévient la mort cellulaire par apoptose.	p. 53
Figure 14. L'uricase prévient la dégénérescence neuronale.	p. 54
Figure 15. Résultats du labyrinthe en croix surélevé.	p. 55
Figure 16. Résultats du test de nage forcée.	p. 56
Figure 17. Résultats du test d'interaction sociale.	p. 57
Figure 18. Concentration de corticostérone plasmatique au sacrifice.	p. 57
Figure 19. Résumé du mode d'action de l'acide urique dans le développement de lésions cérébrales secondaires après le choc hémorragique.	p. 70

Liste des abréviations

A	Amygdale	JS	Jonctions serrées
APS	Persulfate d'ammonium	LAM	Leucocyte adhesion molecule
AVC	Accident vasculaire cérébral	LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen-1
AU	Acide urique	LDL	Low-density lipoprotein
BB	Blocking Buffer	RL	Ringer's Lactate
Bcl2	B-cell lymphoma 2	LRP	Lésions de reperfusion
BE	Bleu d'Evans	MPO	Myéloperoxidase
BHE	Barrière hématoencéphalique	mm Hg	Millimètre de mercure
bpm	Battements par minutes	NaF	Fluorescéine de Sodium
BSA	Albumine sérique de bœuf	Na₃VO₄	Sodium orthovanadate
C1	Caspase-1	NE	Norépinéphrine
C3	Caspase-3	NeuN	Neuronal nuclei
		nfkB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
C8	Caspase-8	NGS	Normal Goat Serum
C9	Caspase-9	NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
CE	Cellules endothéliales	NO	Oxide nitrique
CH	Choc hémorragique	NS	Normal Saline
CHAPS	3[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate	NT	Neurotransmetteur
CH+U	Choc hémorragique traité avec uricase	NVU	Unité neurovasculaire
Cldn-5	Claudine-5	PAMP	Pathogen associated molecular pattern
CRH	Corticotropin-releasing hormone	PBS	Phosphate Buffer Saline
DAMPs	Damage associated molecular patterns	PFA	Paraformaldéhyde
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
DE	Dysfonction endothéliale	PO₂	Pression en oxygène
DOM	Défaillance d'organes multiple	ROS	Espèces réactives de l'oxygène
DTT	Dithiotreitol	SC	Sous-cutané
		SDS	Dodécylsulfate de sodium

EDTA	Acide Éthylènediaminetétraacétique	SHAM	Groupe contrôle
EGTA	Ethylene glycol-bis(β - aminoethyl ether)- <i>N,N,N',N'</i> - tetraacetic acid	SHAM+AU	Contrôle avec injection d'AU extrinsèque
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	HS	Saline hypertonique
EtOH	Éthanol	SL	Système limbique
FJ	Fluorjade	SNC	Système nerveux central
GABA	Acide gama-aminobutyric	S100B	S100 Calcium binding protein B
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	TCC	Traumatisme Crânio- cérébral
H	Hippocampe	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - tetramethylethane-1,2- diamine
HPA	Axe hypothalamo-hypophyso- surrénalien	TLR4	Toll-Like Receptor 4
HTAB	Hexadecyltrimethylammonium	TNF	Tumor necrosis factor
Iba1	Allograft inflammatory factor 1	TRIS	2-amino-2- hydroxyméthylpropane- 1,3-diol
ICAM	Intracellular adhesion molecule	TRIS-HCl	Tris hydrochloride
IF	Immunofluorescence	TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
IL-18	Interleukine 18	UO	Urate oxidase
IP	Intrapéritonéale	VCAM	Vascular cell adhesion protein
IR	Ischémie-reperfusion	WB	Western Blot
		ZO-1	Zonula occludens 1

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé directement ou indirectement dans la réalisation de ce projet.

J'aimerais d'abord remercier mon superviseur Dr. Emmanuel Charbonney pour son implication et ses précieux conseils tout au long de la réalisation de ce projet et de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier les personnes suivantes pour leur assistance et leur implication essentielle dans l'atteinte des objectifs définis pour ce projet :

Dr. Guy Rousseau pour son implication dans mon comité de parrainage et ses judicieux conseils ainsi que Dr. Roger Godbout pour son expertise dans la réalisation et l'interprétation des tests comportementaux.

Mme Caroline Bouchard pour son assistance dans la réalisation des chirurgies et le suivi des animaux ainsi que Dre. Kim Gilbert pour son aide technique dans le laboratoire.

Marc-André Gagné, étudiant à la maîtrise avec qui j'ai évolué de partenaire de laboratoire au baccalauréat à collègues à la maîtrise.

Benjamin Brochu, Joseph Beyrouthy et Chao Liu, stagiaires et étudiant au DESS, pour leur temps passé dans le laboratoire afin de permettre à ce projet d'évoluer.

La Fondation de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal de m'avoir octroyé une bourse J-A de Sève pour la réalisation de ce projet.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents, Anne et Yvon, ainsi que ma sœur, Jef, pour leur support et leurs encouragements. Ainsi qu'un merci tout spécial à mes grands-parents, Réjeanne et Laurent, qui n'ont jamais cessé de croire en moi.

1 Introduction

Les conséquences physiques et cognitives d'un traumatisme grave sur l'état de santé consistent en un fardeau important pour la société canadienne. Les polytraumas représentent plus de 200 000 hospitalisations entraînant plus de 15 000 décès. Près de 60 000 personnes touchées se retrouvent avec des handicaps physiques et/ou psychologiques après ce type d'incident (1). Il est donc de mise d'étudier de nouvelles avenues de traitement, telle que celle proposée par ce travail, afin de réduire ces conséquences.

En plus de l'atteinte tissulaire directe due au trauma, la perte importante (plus de 30%) de volume sanguin, appelée choc hémorragique (CH), entraîne une hypoperfusion (2) qui aggrave les dommages induits par le traumatisme. Le syndrome d'inflammation systémique résultant de la lésion tissulaire extensive (ischémie, stress, nécrose, lésion directe) (3) est secondaire à la libération de médiateurs endogènes en circulation par les cellules mourantes (4). Malgré l'identification de nombreux médiateurs circulants (cytokines, activation du complément et cascades pro-coagulantes) le lien biologique reliant la souffrance tissulaire à l'inflammation et à la perte de fonction des organes reste insuffisamment compris (5).

Ce travail de maîtrise se concentre sur un des éléments biologiques libérés par les cellules apoptotiques/nécrotiques suite au CH (4,6) : l'acide urique (AU) (7). L'implication de l'AU dans les lésions (apoptotiques et inflammatoires) au niveau des organes (poumons et reins) a été préalablement démontrée par notre laboratoire (7). Le traitement ciblé afin de réduire cette molécule à l'aide d'une uricase, métabolisant l'AU en allantoïne (8), réduit les conséquences systémiques de l'hypoperfusion (7). L'objectif de ce mémoire est d'élucider l'implication de l'AU dans l'atteinte du système nerveux central (SNC) suite au CH; particulièrement, son impact sur la barrière hématoencéphalique (BHE), l'atteinte parenchymateuse cérébrale et la neuroinflammation. Dans cette introduction, la description des phénomènes physiologiques du CH, ses traitements, ainsi que ses conséquences seront d'abord présentés. Nous discuterons ensuite du rôle de médiateurs circulants, les alarmines, plus précisément de l'AU dans la défaillance d'organes multiple (DOM). Finalement, le SNC et la barrière

hématoencéphalique, de même que les évidences soutenant l'hypothèse d'atteinte du SNC par l'AU après le CH seront présentées.

1.1 Le choc hémorragique

1.1.1 Description générale

Un état de choc est défini comme une circulation sanguine insuffisante pour permettre un métabolisme cellulaire aérobie (9), c'est-à-dire une diminution de la perfusion sanguine, contenant nutriments et oxygène, au niveau tissulaire (9,10). Le syndrome clinique de choc hémorragique est causé par une perte sanguine importante, sous forme d'hémorragie, entraînant une insuffisance circulatoire (10). Le CH, souvent observé suite à un polytrauma, est défini comme une situation où au moins deux régions corporelles sont atteintes par des blessures graves (11). Dans cette situation, le CH peut être responsable de la mortalité précoce ou peut contribuer secondairement à l'exacerbation de la réponse inflammatoire au niveau des organes (11,12). Les causes du choc hémorragique sont nombreuses, mais on retrouve principalement les traumatismes graves, les lésions vasculaires et les hémorragies abdominales (13).

Dans un organisme vivant, le CH entraîne l'hypoxie et l'ischémie tissulaire (10). L'hypoxie est une diminution de la PO_2 au niveau des organes (14), l'ischémie étant définie comme une diminution de la perfusion sanguine donc de l'apport en nutriments, inférieur aux besoins. Dans le cas du CH, on parle d'une ischémie systémique, touchant l'organisme entier, menant au transport insuffisant d'oxygène et de nutriments aux organes vitaux (15). Ces phénomènes entraînent des lésions cellulaires qui mènent à la libération de médiateurs circulants qui peuvent exacerber la réponse inflammatoire systémique et participer aux atteintes secondaires des organes (12).

La gravité du CH est caractérisée selon quatre stades, en fonctions du pourcentage du volume sanguin perdu et des manifestations cliniques. Les stades I et II incluent des pertes sanguines jusqu'à 30%. Ils sont considérés comme pré-choc, car le corps peut compenser la perte sanguine si l'hémorragie est contrôlée. Les mécanismes de compensation à ce stade sont la vasoconstriction périphérique au niveau de certains organes (foie, reins, pancréas et tractus

gastrointestinal), afin de préserver les organes essentiels (cœur et cerveau). L'hémorragie de stade III est qualifiée d'état de choc et elle correspond à une perte sanguine de 30-40%. À ce stade, les cellules commencent à métaboliser le glucose de manière anaérobie, elles entrent dans un mode hypoxique. Ce type de métabolisme favorise la mort cellulaire, par apoptose ou nécrose, et mène à la production d'acide lactique responsable de l'acidose métabolique (16). La mort cellulaire augmentée par le métabolisme anaérobie peut aussi être causée par des dommages mitochondriaux secondaires à l'augmentation du calcium intracellulaire (17). Les cellules mourantes libèrent en circulation de nombreux médiateurs, dont des molécules associées au dommage cellulaire (DAMPs). Certains de ces DAMPs, appelés alarmines, vont soit activer le système immunitaire ou avoir un impact cellulaire à distance (10, 11). Certaines alarmines pourraient également favoriser la mort cellulaire secondaire et l'inflammation systémique initiée par le CH. Si non traitée, l'hémorragie de classe III mène à une perte de fonction des organes vitaux parallèlement à l'acidose métabolique (9). Dans le cadre de nos études présentées plus loin, nous nous intéressons à cette classe d'hémorragie puisqu'elle entraîne des conséquences graves sur l'organisme qui peuvent être prévenues, si traitées adéquatement. Les hémorragies de classe IV sont terminales et correspondent à une perte de plus de 40% du volume sanguin circulant. À ce stade, dans un dernier effort de survie, le corps sécrète une grande quantité de catécholamines entraînant une tachycardie, puis éventuellement la mort (16).

Différents modèles animaux sont utilisés pour l'étude du CH reperfusé ; les deux techniques décrites brièvement ici sont plus fréquemment utilisées. La première technique est le retrait sanguin et la reperfusion contrôlés, à l'aide de la canulation de la veine fémorale. Une canule artérielle fémorale permet parallèlement la mesure invasive de la pression artérielle. Cette technique est la plus commune et a été utilisée dans des modèles de chien, de porcs et de rats (19–21). Afin de simuler l'hémorragie abdominale incontrôlée, une laparotomie est parfois utilisée dans d'autres modèles. Cette technique permet un contrôle moins étroit des paramètres du CH et ce dernier modèle a surtout été utilisé chez le cochon (22). Dans certains cas, un modèle de CH non-reperfusé par « bleeding-out » est aussi utilisé pour l'étude des conséquences du choc sans reperfusion (23). Pour notre projet, nous souhaitons

particulièrement avoir un modèle de CH réanimé avec survie, afin d'évaluer l'évolution de l'atteinte des organes ; nous avons donc utilisé un modèle de CH contrôlé et reperfusé à l'aide de canulation de la veine fémorale.

L'intervention principale pour le traitement d'un CH, en dehors du contrôle de la source de l'hémorragie, est le remplacement du volume sanguin perdu, soit par des fluides ou des produits sanguins. Les différents types de fluides utilisés ainsi que leurs avantages/inconvénients sont décrits dans la section suivante.

1.1.2 Traitements

1.1.2.1 Remplacement du volume liquidien perdu

Pour remplacer le volume liquidien perdu et rétablir le volume circulant lors du CH deux classes de fluides sont utilisées : les fluides de remplacement (cristalloïdes/colloïdes) et les produits sanguins (plasma, globules rouges...). L'utilisation de ces substances entraîne une expansion volémique, rétablir le volume circulant et du fait même l'apport d'oxygène aux tissus (24).

Les cristalloïdes sont peu coûteux et peuvent être isotoniques ou hypertoniques (24). Les principaux cristalloïdes utilisés pour la reperfusion à la suite du choc hémorragique sont la saline normale (NS) (25), le Lactate Ringer's (RL) (26) et la saline hypertonique (SH) (15). À cause des problèmes liés à l'utilisation de la NS causant une hyperchlorémie, l'utilisation du RL a été fréquemment testée et présente plusieurs avantages. Une étude par *Saunders et al.* a démontré que l'utilisation de RL permet de rétablir le volume extracellulaire et d'améliorer la survie dans un modèle de CH chez le chien lorsque comparée avec la reperfusion exclusivement avec du sang (27). Une autre étude par *McClelland et al.*, a démontré, toujours chez le chien, que le RL diminue l'acidose métabolique et augmente la perfusion (26). L'utilisation de la SH a produit des conclusions divergentes sur son efficacité avec quelques études démontrant ses effets bénéfiques (28–30). Nous avons donc décidé d'utiliser le RL en association avec la restitution d'une partie du sang entier retiré afin d'optimiser la circulation(10).

Après la réanimation liquidienne d'une hypoperfusion massive, un effet délétère, sous forme de lésions tissulaires, est parfois observé. Ce sont les lésions de reperfusion (LRP). Plusieurs approches ayant pour but de minimiser les LRP ont été tentées, incluant l'utilisation de vasopresseurs favorisant la vasoconstriction et permettant de réduire la quantité de fluides requise afin de rétablir une pression sanguine adéquate (31–33). La prochaine section décrira des éléments caractérisant les LRP et la DOM de conséquence à ces lésions.

1.1.2.2 Effets de la reperfusion : Les lésions de reperfusion

Le rétablissement d'un débit sanguin normal est essentiel afin d'éviter les dommages permanents. Cependant, la reperfusion elle-même peut favoriser les lésions tissulaires et la mort cellulaire par nécrose et apoptose. La nécrose arrive de manière accidentelle lorsque la lésion cellulaire est trop importante (34). Dans les conditions d'ischémie, la nécrose a été détectée dans des pathologies telles que l'infarctus du myocarde (35) et l'accident vasculaire cérébral (AVC) (36). De plus, la nécrose, plus précisément la nécroptose, est reconnue comme étant le principal type de mort cellulaire dans les LRP(37).

Par contre, les études préalablement faites dans notre modèle ont aussi démontré une implication du CH et de l'AU dans les LRP par une activation de l'apoptose (7). Dans le cerveau, il a été démontré que malgré que la nécrose joue un rôle immédiat suivant une ischémie, l'apoptose est impliquée de manière plus tardive et pourrait avoir des conséquences à long terme (38). C'est pourquoi pour ce projet nous nous sommes concentrés sur les voies apoptotiques qui seront détaillées plus loin. D'ailleurs, les LRP sont reconnues comme impliquant le calcium intracellulaire, les lésions mitochondriales (17,39) et l'inflammation tissulaire (40) qui peuvent activer l'apoptose. La sévérité de l'ischémie est corrélée à l'intensité des LRP (41). Les LRP touchent particulièrement les cellules endothéliales (CEs) qui voient leur structure (distribution ionique, potentiel membranaire...) grandement altérée après la reperfusion (42). Les CEs sécrètent aussi des cytokines favorisant un environnement pro-inflammatoire (43). La sensibilité particulière de l'endothélium à la présence en circulation de médiateurs potentiellement délétères justifie notre intérêt pour l'étude de l'AU dans l'altération de la perméabilité de la BHE suite au CH.

1.1.3 Complications causées par les lésions de reperfusion

Après un CH suivi d'une réanimation liquidienne, les patients touchés par des LRP peuvent subir des complications entraînant dans certains cas le décès. En cas de survie (après la réanimation liquidienne), les complications sont la défaillance d'organe multiple (DOM) et l'apparition d'infections pouvant mener à la septicémie (44). Lors de la période de récupération, l'agitation et le dysfonctionnement cérébral sont fréquents chez les patients, raison pour laquelle nous nous intéressons plus particulièrement à l'atteinte du SNC (45,46).

1.1.3.1 Défaillance d'organe

1.1.3.1.1 Concept clinique

La DOM se développe ultérieurement chez les patients ayant subi un CH et se définit comme une perte de fonction, transitoire ou permanente, au niveau d'organes essentiels à la survie (47). La cause principale de la DOM est la vasoconstriction au niveau des organes menant à une diminution de la perfusion durant la période ischémique du CH (13). De plus, l'hypoxémie et l'acidose métabolique causée par le métabolisme cellulaire anaérobie peuvent favoriser les dommages (19). D'autres phénomènes tissulaires sont également impliqués lors de la reperfusion (42,43).

1.1.3.1.2 Pathophysiologie

La DOM est déterminée par la mesure de paramètres cliniques ou de laboratoire. Six systèmes principaux peuvent être touchés : respiratoire, cardiovasculaire, rénal, hépatique, neurologique et hématologique (48). Dans ce projet, nous nous intéressons aux conséquences sur le SNC, donc au système neurologique.

Suite à la réanimation d'un trauma, les larges volumes de liquides nécessaires à la reperfusion sont associés à un risque accru de DOM et de mortalité (44). Notre laboratoire a démontré que l'utilisation de vasopresseurs permet de diminuer la quantité de fluides nécessaires à la réanimation, sans effets délétères au niveau des poumons et des reins, mais avec un effet potentiellement bénéfique pour le SNC (33).

1.1.3.1.3 Implications des cellules endothéliales et atteinte tissulaire

Les LRP touchent principalement l'endothélium qui constitue plus qu'une simple barrière entre la circulation et les tissus. L'importance de l'endothélium dans les LRP et le développement de la DOM s'exprime principalement par deux éléments : la régulation de l'adhésion des cellules inflammatoires et l'altération de la fonction de l'oxide nitrique (NO) (49). Les molécules d'adhésion des cellules inflammatoires (LAMs) telles que ICAM-1 («Intercellular Adhesion Molecule 1») permettent l'adhésion des leucocytes, particulièrement des neutrophiles, et leur infiltration dans les tissus par les mécanismes de migration transendothéliale (50–52). L'expression d'ICAM-1 par les CEs est aussi augmentée après l'ischémie (53).

L'ischémie mène aussi à la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui influencent la fonction du NO, gaz soluble produit par les CEs (54,55). Dans la circulation, le NO favorise la production de GMPc ayant diverses fonctions au sein des CEs, dont le maintien d'un environnement favorable à leur survie (55). Dans les grands vaisseaux, l'effet protecteur du NO est d'empêcher le vasospasme et de diminuer l'expression des LAMs par les CEs, diminuant l'infiltration des leucocytes dans la paroi et la réponse inflammatoire (56). Lorsqu'il entre en contact avec des ROS, le NO est détruit. Le NO peut aussi réagir avec le superoxide (une forme de ROS) pour créer des substances cytotoxiques (par exemple nNOS) (49). Une étude par *Sordi et al.* démontre l'implication du nNOS, formé à partir du NO, dans l'accumulation de neutrophiles dans les organes et l'atteinte de l'endothélium (54).

Finalement, la DOM est également expliquée par une augmentation de l'apoptose au niveau des organes. Des études ont démontré de l'apoptose au niveau des poumons, des reins, du foie, du thymus, des intestins et de la rate suite au trauma incluant un CH (7,57). L'apoptose serait aussi responsable de la libération de médiateurs, les alarmines, en circulation (4).

1.1.3.1.4 Rôle des médiateurs libérés

Une cause de la DOM est la circulation de médiateurs inflammatoires (DAMPs, cytokines...) libérés par les cellules mourantes. Ces médiateurs sont nommés alarmines, car ils alertent le système immunitaire, favorisant ainsi son activation (4). De nombreuses alarmines ont des fonctions physiologiques au sein des cellules et sont libérées en circulation par la mort cellulaire devenant des médiateurs circulants (58). Le rôle pro-inflammatoire de certaines alarmines peut être expliqué par leur liaison aux récepteurs TLR4 (« Toll-Like Receptors-4 ») exprimés par les cellules du système immunitaire et les cellules endothéliales (18,54). Étant donné son potentiel à créer des lésions cellulaires et la description de son effet néfaste sur les organes dans d'autres situations médicales (i.e le syndrome de lyse tumorale, la goutte), nous sommes intéressés particulièrement à l'acide urique (60). Depuis plusieurs décennies, l'augmentation précoce de la circulation plasmatique d'AU dans les modèles de CH a été décrite (61,62) et son potentiel pro-inflammatoire suite à des lésions tissulaires est élevé (6,63–65).

1.2 Notre alarmine d'intérêt : l'acide urique

1.2.1 Définition

L'acide urique (AU) est issu du métabolisme des purines (66). Les purines proviennent de diverses sources endogènes ou exogènes. Les organes (endogène), source de purines, sont le foie, les intestins, les muscles, les reins et l'endothélium. La principale source exogène de purines est les protéines animales (67). À forte concentration, l'AU peut former des cristaux impliqués dans diverses pathologies telles que la goutte et les pierres aux reins (68,69). Par contre, l'acide urique soluble peut aussi avoir des effets pro-inflammatoires (70–72). Des associations épidémiologiques sont également décrites entre une concentration élevée d'AU circulant et divers syndromes métaboliques (73) et maladies cardiovasculaires (66).

Cependant, son effet le plus dévastateur est connu chez les patients traités pour des tumeurs hématologiques et développant un syndrome de lyse tumorale (60,74,75). Dans le syndrome de lyse tumorale, on observe une mort cellulaire massive au niveau des tumeurs entraînant l'augmentation de la circulation d'AU et de la dysfonction d'organes (74).

1.2.2 Métabolisme

Chez l'animal, l'enzyme urate oxidase (UO) est responsable du métabolisme de l'AU en allantoiné, un métabolite inoffensif pour l'organisme (67). Chez l'humain, UO a été perdue au cours de l'évolution (76), ce qui lui confère un avantage évolutif (77). Ces avantages chez l'humain sont une augmentation du stockage des lipides favorisée par l'AU et sa fonction comme antioxydant puissant (78). En l'absence d'UO, le principal mécanisme d'élimination de l'AU chez l'humain se fait par excrétion rénale au 2/3 et par l'intestin (67).

Le traitement ciblé contre l'AU utilisé dans ce projet est la rasburicase (Sanofi-Aventis Canada Inc., Canada) une version recombinante de l'enzyme UO. La dégradation de l'AU en allantoiné à l'aide de la rasburicase permet son excrétion plus rapide (8). La rasburicase est déjà utilisée dans le syndrome de lyse tumorale afin de contrecarrer la libération massive d'AU en circulation (79). Nous avons choisi d'utiliser la rasburicase puisqu'elle agit directement et spécifiquement sur l'AU, en comparaison à l'allopurinol qui est fréquemment utilisé pour le traitement de l'hyperuricémie. En effet, l'allopurinol est un inhibiteur de la xanthine oxidase, une enzyme essentielle à la production d'AU. L'allopurinol vient donc diminuer la production d'AU et sa circulation, mais doit être donné de manière préventive ce qui serait peu réaliste dans le contexte clinique du CH (67,80). En effet, la rasburicase, étant une enzyme spécifique, peut être donnée au moment de la reperfusion et tout de même avoir son effet de réduire l'AU circulant.

1.2.3 Rôle dans l'organisme

Pendant une longue période, on croyait que l'AU était un métabolite inoffensif du métabolisme des purines. Cependant, ses fonctions physiologiques ont été rapportées comme ayant deux faces de la médaille, une antioxydante et une prooxydante avec un rôle dans l'initiation de la réponse inflammatoire (66,81).

1.2.3.1 Antioxydant

L'acide urique est considéré comme un antioxydant, car il a la capacité de capter efficacement les ROS réduisant ainsi le stress oxydatif (82). En tant qu'antioxydant les effets bénéfiques de l'AU sont évoqués dans plusieurs pathologies particulièrement celles du SNC. Par exemple,

après un accident vasculaire cérébral (AVC) une concentration d'AU circulant augmentée est associée avec une diminution des séquelles neurologiques (83). Il est possible que la libération de ROS et le stress oxydatif après l'AVC entraînent une réponse inflammatoire accrue (84). Étant donné que le SNC est étroitement protégé par la BHE, il a accès à peu d'agents antioxydants (85), la circulation d'AU pourrait donc réduire les ROS au niveau cérébral. Cela est surprenant, car en situation d'homéostasie l'AU ne passe pas la BHE (86). Une autre étude *in vitro*, sur des cultures de neurones traités avec l'AU, a démontré que l'AU atténue le stress oxydatif. Dans la même étude, l'administration d'AU est associée avec une diminution de la taille d'infarctus causé par l'AVC (87). Ceci n'étant que des associations, la relation de cause à effet n'est pas démontrée. À l'opposé, certaines études épidémiologiques ont aussi démontré qu'une augmentation de l'AU circulant est associée à un mauvais pronostic après l'AVC (88). Une autre condition, où l'AU semble bénéfique pour le SNC, est la sclérose en plaque, une maladie neurodégénérative. Dans un modèle de sclérose en plaques chez la souris, le traitement avec l'AU diminue les dommages cérébraux et du fait même les risques de paralysie (89). Il semble également que l'AU aide au maintien de l'intégrité de la BHE dans cette pathologie chronique, en venant éliminer les ROS participant à sa destruction (90).

1.2.3.2 Agent prooxydant

Dans d'autres conditions, l'AU est un agent prooxydant (produisant des ROS) très puissant, donc nuisible pour le corps humain. En effet, dans le syndrome métabolique, le diabète de type II et l'hypertension artérielle, l'AU circulant élevé est considéré comme un facteur aggravant à cause de son rôle prooxydant (91). Lorsque mis en contact avec des substances contenant des éléments monooxygénés, l'AU peut produire des ROS (92). Il a été démontré que l'AU peut oxyder les lipides LDL (« low-density lipoprotein ») en présence d'autres substances prooxydantes et que l'environnement hydrophobe généré par les lipides entraîne une diminution de l'effet antioxydant de l'AU (93).

1.2.3.3 Implication de l'AU dans la réponse inflammatoire

Un autre effet négatif, non-négligeable, de l'AU est son effet pro-inflammatoire. L'AU est reconnu comme une substance pro-inflammatoire libérée par les cellules nécrotiques et apoptotiques (94–96). Même sous sa forme soluble, l'AU joue divers rôles pro-inflammatoires en activant le système immunitaire (65,70,71). Il est impliqué dans l'activation de la voie NfκB (71). Cependant, le mécanisme intracellulaire le mieux décrit au niveau des cellules immunitaires est l'activation par l'AU de l'inflammasome [NLRP3](71). Ce dernier est formé d'un regroupement de protéines, dont la caspase-1 (C1), qui, lorsqu'activée, mènent à la production d'IL-1β et d'IL-18, deux cytokines pro-inflammatoires (97–99). Une partie de l'activation se fait par le biais du récepteur TLR4, menant au clivage de la pro-IL-1β en IL-1β par la C1 (99–101).

Dans notre modèle murin de CH, nous avons démontré que la destruction de l'AU circulant libéré après le CH, à l'aide d'une uricase, prévient l'apoptose et l'inflammation au niveau des reins et des poumons (7).

La littérature décrit fréquemment un polytrauma comme une combinaison de CH et un traumatisme crânio-cérébral (TCC)(3); des conséquences cognitives sont souvent observées chez ces patients (102). Afin d'étudier le rôle de l'AU dans ses phénomènes, nous nous sommes concentrés sur le système limbique (SL) à cause de son implication particulière dans la régulation des comportements anxieux.

1.3 Le système limbique

Le système limbique est la région du cerveau qui est responsable de la régulation des émotions et de la mémoire. Le système limbique comprend entre autres l'amygdale (A) et l'hippocampe (H) (103). Pour ce projet, nous nous sommes intéressés spécifiquement à ces deux régions à cause de leur implication dans le développement de l'anxiété et la dépression ainsi que leur sensibilité particulière à l'ischémie. En effet, une augmentation de l'anxiété et de la dépression est décrite chez les patients ayant subi un AVC touchant ces régions (104).

1.3.1 Implication du système limbique dans l'anxiété et la dépression

Une atteinte du système limbique par la réponse inflammatoire et l'apoptose se traduit par une augmentation de l'anxiété qui est à la base de la majorité des problèmes de santé mentale et de dépression (105). L'anxiété est une réponse comportementale normale de l'organisme ayant pour but d'assurer sa survie, mais qui, lorsque maintenue de manière chronique, peut devenir néfaste (106). Un marqueur plasmatique de l'anxiété est la corticostérone, une substance de la famille des glucocorticoïdes qui est sécrétée par le cortex surrénalien en réponse à des situations physiologiquement ou psychologiquement stressantes (107). En effet, l'administration extrinsèque de corticostérone augmente l'anxiété dans un modèle murin (108).

Deux régions du système limbique sont reconnues pour leur implication dans l'initiation de l'anxiété : l'amygdale et l'hippocampe.

La région la plus impliquée dans le développement de comportements anxieux est l'amygdale. Le neurotransmetteur (NT) le plus important dans la dépression est le GABA (« gamma aminobutyric acid »), qui diminue l'hyperexcitabilité neuronale observée dans l'anxiété chronique (109). Les principaux interneurons GABAergiques se retrouvent au niveau de l'amygdale (110). Une étude de *Guadagno et al.*, dans de jeunes rats, démontre une hyperexcitabilité de l'amygdale lorsque les animaux se retrouvent dans des situations stressantes (111).

Une atteinte inflammatoire au niveau de l'hippocampe peut aussi entraîner des comportements anxieux. Par exemple, l'augmentation de l'IL-1 β , principale cytokine impliquée dans l'anxiété (112), dans l'hippocampe mène à une augmentation des problèmes cognitifs favorisant le développement de l'anxiété et la dépression (113). L'hippocampe est aussi particulièrement sensible à l'ischémie. En effet, les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe sont les plus touchés par une ischémie systémique telle qu'observée dans le CH (114,115). Malgré une ischémie globale touchant toutes les régions du cerveau, l'hippocampe est atteint de manière plus sélective à cause de sa sensibilité accrue et spécifique à l'IR (114).

1.3.2 Principales lésions du SNC : Neuroinflammation et apoptose

Un lien est établi entre la dépression et la réponse inflammatoire au niveau cérébral (112,116). De plus, la mort cellulaire programmée par apoptose dans des régions données du cerveau peut favoriser le développement d'anxiété et de dépression. Par exemple, la consommation de drogues à dose élevée entraîne une augmentation de l'apoptose au niveau de l'hippocampe causant de l'anxiété (117). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au lien entre l'IR, la neuroinflammation, l'apoptose et le développement de comportements anxieux secondaires à l'AU circulant. Pour ce faire, nous avons ciblé précisément l'AU à l'aide d'une uricase.

1.3.2.1 La neuroinflammation

La neuroinflammation est un phénomène non-exclusif au CH, mais qui se développe de manière similaire dans plusieurs pathologies. L'inflammation dans le SNC implique des cellules inflammatoires provenant de deux sources : les cellules résidentes (glies) qui ne migrent pas vers les ganglions et l'infiltration par les cellules immunitaires circulantes, suivant l'altération de la perméabilité de la BHE. En conditions normales, le SNC est en conditions d'exclusivité immunitaire. C'est-à-dire que des pathogènes injectés directement dans le cerveau ne peuvent pas activer la réponse immunitaire systémique. Par contre, si une réponse inflammatoire est déclenchée dans le SNC, les cellules résidentes peuvent favoriser le recrutement des cellules inflammatoires systémiques (118).

Les cellules gliales sont les principales cellules inflammatoires résidentes. Deux types cellulaires sont impliqués dans la réponse inflammatoire : les astrocytes (ou astroglies) et la microglie. La protéine S100B est un marqueur fréquemment utilisé pour la détection de la neuroinflammation (19), car elle promeut la croissance des astrocytes qui est signe d'une réponse neuroinflammatoire (119). Un autre marqueur plus spécifiquement associé aux astrocytes matures est la protéine GFAP (« glial fibrillary acidic protein ») (120). De plus, dans des circonstances inflammatoires, les astrocytes peuvent surexprimer GFAP (121). Au sein du SNC, les astrocytes sont principalement responsables de la réparation au site d'une lésion (122). En effet, lors d'un TCC ou d'un AVC, on observe fréquemment la formation d'une cicatrice astrogliale (123,124). L'activation de l'astroglie, qui se caractérise par une hyperplasie

et une prolifération cellulaire, après une atteinte du SNC est problématique, car elle peut diminuer la capacité de régénération des neurones (125). En effet, en présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α , les astrocytes activés sécrètent des facteurs neurotoxiques entraînant une mort neuronale accrue (126,127). Après un TCC, les astrocytes peuvent aussi participer à la neurogénèse anormale (128). Les astrocytes assurent donc le maintien de l'intégrité du SNC après une lésion, mais peuvent aussi favoriser des dommages plus importants en sécrétant des facteurs neurotoxiques.

La microglie est la principale source d'IL-1 β et d'autres facteurs favorisant le recrutement des cellules inflammatoires systémiques (129,130). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de ROS par la microglie accélère la mort des neurones et augmente ainsi la lésion (130). La microglie est aussi responsable de la phagocytose dans le SNC (131). Les cellules microgliales activées sont très mobiles passant d'une forme ramifiée à une forme d'amibe (131). Elle phagocyte principalement des microbes, des cellules mortes et des agrégats protéiques. L'activation de la microglie se fait principalement via les TLRs qui peuvent détecter autant la présence de PAMPs (molécules associées aux pathogènes) que de DAMPs (130). Lorsque la microglie est activée, elle exprime la protéine spécifique Iba1 (« Ionized calcium-binding adapter molecule-1 ») (132). De plus, la microglie participe à la formation de la cicatrice astrogliale en activant les astrocytes qui sont en dormance en homéostasie (133).

Il est parfois nécessaire de recruter les cellules inflammatoires systémiques, telles que les neutrophiles, pour favoriser la réponse inflammatoire cérébrale (118). Avant de pouvoir passer au SNC par transmigration endothéliale (134), les neutrophiles doivent adhérer aux LAMs exprimés par les CEs de la BHE, donc sa perméabilité est altérée (135). L'IL-1 β contribue au recrutement des neutrophiles au SNC (136). Après avoir transmigré dans le SNC, les neutrophiles deviennent pro-inflammatoires et neurotoxiques favorisant la mort neuronale (137).

En résumé, la neuroinflammation déclenchée par des lésions ou des pathogènes dans le SNC peut exacerber la mort neuronale qui se fait principalement par apoptose.

1.3.2.2 Apoptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire programmée qui mène au désassemblage du cytosquelette, à la condensation de la chromatine et à la fragmentation de l'ADN (138). L'apoptose est initiée via deux voies (extrinsèque et intrinsèque) qui sont induites par des enzymes spécifiques nommées caspases (139). Les caspases sont des protéases qui régulent parallèlement l'apoptose et la réponse inflammatoire (140). Lors du CH, les deux voies apoptotiques sont activées.

La voie extrinsèque est activée via l'enzyme initiatrice : caspase-8 (C8) (139). La C8 peut être activée par la présence de cellules inflammatoires tels les neutrophiles (141). De plus, l'accumulation de neutrophiles au niveau des organes et du cerveau après le CH a préalablement été démontrée par notre laboratoire (7,33). Une fois activée, la C8 peut avoir diverses fonctions, dont l'activation de l'inflammasome NLRP3, augmentant la production d'IL-1 β (99). L'activation de la C8 peut aussi entraîner l'activation de la caspase-3 (C3) qui est la caspase effectrice de la cascade apoptotique menant directement à la mort cellulaire (139).

La voie apoptotique intrinsèque peut aussi être activée dans le CH par la présence de ROS, menant à la libération du cytochrome c par les membranes internes des mitochondries. La caspase initiatrice de la voie intrinsèque est la caspase-9 (C9) (139). L'ischémie est reconnue comme entraînant une augmentation de la production de ROS et permet ainsi l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose (139). L'AU favorise aussi l'apoptose par la voie intrinsèque, à travers la génération de ROS (142).

1.3.2.3 Effet de l'ischémie sur les lésions du SNC

La neuroinflammation est activée durant le CH puisque l'IR diminue la capacité de défense du SNC (143). En effet, l'ischémie et la circulation d'AU brisent l'exclusivité immunitaire du SNC activant ainsi la réponse inflammatoire. Après une IR, l'altération passe principalement par la voie TLR4/nf κ B exprimée dans la microglie (144). Le CH active donc les cellules inflammatoires locales qui favorisent le recrutement de cellules immunitaires circulantes. Après le CH, on observe une augmentation en circulation de la protéine S100B, libérée par l'astroglie lors de lésions, qui est partiellement renversée par la reperfusion (19,22). De plus, une augmentation

du nombre de microglies activées par une coloration de Iba1 est démontrée dans le SNC après CH (145). La présence de MPO, donc de neutrophiles, a également été démontrée (20).

Plusieurs études se sont intéressées à la mort cellulaire par apoptose dans le cerveau après le CH. Diverses techniques ont été utilisées et viennent confirmer que l'IR est pro-apoptotique. Un premier marqueur utilisé est la protéine Bcl2 (« B-cell lymphoma 2 »), impliqué dans la survie cellulaire. Une étude par *Mccarron et al.*, a démontré une diminution de l'expression de Bcl2 durant le CH, mais un retour à des niveaux normaux après la reperfusion. Dans cette étude, on précise que la protéine Bcl2 est principalement exprimée par les neurones et que la reperfusion pourrait prévenir la mort neuronale (146). De manière plus spécifique, une coloration visant les cellules apoptotiques, démontre une augmentation de l'apoptose dans le cerveau après CH (20). Une étude par *Kudo et al.*, s'est intéressée plus particulièrement à la région CA1 de l'hippocampe. Des colorations TUNEL (« Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling ») et FJ (fluorochrome) effectuées dans le CA1, après le CH, démontrent une augmentation de l'apoptose touchant particulièrement les neurones. De plus, il y a perte de la structure histologique stratifiée (147) de la région CA1 (148) qui pourrait être un signe de sa dysfonction.

L'AU pourrait être impliqué dans les lésions du SNC après l'IR à cause de son rôle en tant qu'alarmine lui donnant la capacité d'activer la réponse inflammatoire et l'impliquant dans la formation de ROS qui peuvent être pro-apoptotiques.

1.4 **La barrière hématoencéphalique**

Le cerveau est protégé par divers mécanismes d'autorégulation (143) et par une barrière endothéliale étanche nommée barrière hématoencéphalique (BHE), principale ligne de défense contre les pathogènes et les toxines de la circulation systémique (149). Cette barrière est médiée par les cellules endothéliales (CE) hautement spécialisées des vaisseaux sanguins alimentant le SNC (150).

1.4.1 Structure et fonction

La sous-unité fonctionnelle de la BHE (Figure 1) est l'unité neurovasculaire (NVU). La NVU est composée de CEs, de deux lames basales, de péricytes qui sont étroitement liés aux CEs et des cellules gliales (astrocytes) (151,152).

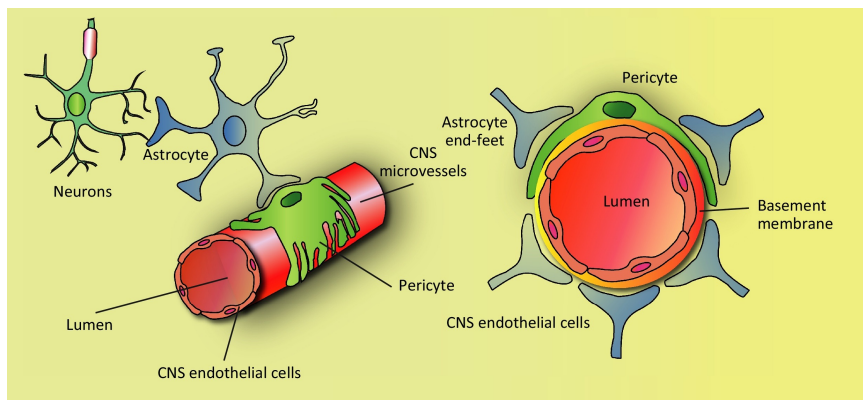


Figure 1. Structure de la barrière hématoencéphalique (BHE). Représentation des constituants cellulaires de la BHE : les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes formant l'unité neurovasculaire (NVU). Figure tirée de : Chow et al. 2015 (153). License d'utilisation obtenue à l'aide de RightsLink.

Les cellules endothéliales de la BHE possèdent plusieurs caractéristiques qui les différencient de l'endothélium microvasculaire du reste du corps et leur conférant des similitudes avec les cellules épithéliales. L'endothélium de la BHE est hautement polarisé avec une distribution inégale des enzymes du côté luminal et basolatéral (154). De plus, la présence de transporteur sur les deux faces des cellules endothéliales confirme que l'endothélium de la BHE assure le transport de substances dans les deux sens soit de la circulation au cerveau et du cerveau à la circulation systémique (150). Cette polarisation est maintenue par les jonctions serrées (JS) entre les cellules endothéliales. Les principales protéines de jonctions présentes dans l'endothélium du SNC sont la claudine-5 (Cldn5), *zonula occludens* 1 (ZO-1) et l'occludine (155,156). Les JS assurent aussi l'étanchéité de l'endothélium (155–157) en addition à la superposition des prolongements cellulaires des CEs. De plus, contrairement à l'endothélium microvasculaire du reste du corps, l'endothélium de la BHE ne présente pas de fenestrations (149,158). Il y a donc peu de transfert paracellulaire de substances. Le faible transport des substances entre la circulation systémique et le cerveau est aussi assuré par la faible quantité de vésicules pycnotiques dans le cytoplasme des cellules endothéliales de la BHE (157). Pour

assurer la fonction d'exclusivité immunitaire du SNC, les cellules endothéliales de la BHE expriment une faible quantité de LAMs tels que ICAM-1 et VCAM (28,33). De cette manière, les cellules inflammatoires systémiques telles que les neutrophiles et les leucocytes sont peu attirés au SNC (160).

Les péricytes font aussi partie de la BHE. Ces cellules ont des fonctions dans la régulation du flot sanguin et la cicatrisation des vaisseaux du SNC (161,162). Les cellules gliales sont la dernière classe de cellules composant la NVU. Les principales cellules gliales favorisant le maintien de l'étanchéité de la BHE sont les astrocytes (163). Lorsqu'il y a atteinte à l'endothélium de la BHE, les astrocytes de concert avec les péricytes vont prendre de l'expansion dans le but de compenser la perte d'étanchéité afin de maintenir l'intégrité de la BHE (122).

La BHE possède diverses fonctions dont la principale est le maintien de l'homéostasie dans le SNC. Elle participe au bon fonctionnement neuronal et en protégeant le SNC des pathogènes, des toxines et de l'inflammation. De plus, la BHE assure l'exclusivité immunitaire du SNC en empêchant les cellules inflammatoires systémiques d'y pénétrer (135).

1.4.2 Bris de l'exclusivité immunitaire du SNC secondaire à l'inflammation

Dans le cas d'une réponse inflammatoire systémique, les cellules endothéliales peuvent exprimer des molécules d'adhésion, pour les cellules immunitaires circulantes, qui sont normalement peu exprimées au niveau de l'endothélium du SNC (164). La présence des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β favorise l'expression de ICAM-1 par les CEs via la voie Nf κ B (165). L'expression de ICAM-1 par les CEs de la BHE favorise l'infiltration des leucocytes, car la liaison entre ICAM-1 (exprimées par les CEs) et LFA-1 (exprimée par les leucocytes) permet une liaison solide entre ces deux types cellulaires (166).

1.4.3 Altération de la perméabilité de la BHE par l'ischémie et l'acide urique

L'altération de la perméabilité de la BHE par l'IR pourrait se faire en influençant deux éléments clés de l'étanchéité de la BHE: l'altération des jonctions serrées entre les CE et l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion des cellules inflammatoires. En effet, les CE traitées avec de l'AU *in vitro* développent une dysfonction endothéliale se traduisant par une diminution de la production de NO (167–169) et l'augmentation d'expression de ICAM-1 (170). Il est important de noter que l'IR n'a pas d'effet sur la viabilité des CE (171).

Pour mesurer l'altération des JSs entre les CE de la BHE au sein d'un organisme vivant, deux marqueurs injectés par voie IP sont principalement utilisés: le Bleu d'Evans (BE) et la fluorescéine de sodium (NaF). Ces marqueurs sont utilisés pour l'étude de l'altération de la perméabilité paracellulaire à cause de leur faible poids moléculaire soit 971 Da pour le BE et de 376 Da pour la NaF. Par contre, le BE peut se lier à l'albumine sérique pour devenir un marqueur avec un poids moléculaire élevé alors que la NaF reste libre en circulation. En conditions saines, autant le BE que le NaF sont distribués de manière uniforme dans les organes par la circulation systémique, mais ne pénètrent pas dans le SNC (172). Dans une situation d'IR locale (AVC), l'IL-1 β est impliquée dans l'altération de la perméabilité de la BHE avec une augmentation de la perméabilité au bleu d'Evans due à une atteinte des protéines de jonctions cellulaires (ZO-1, Cldn-5 et occludine) (28,29,30). Ce phénomène d'altération des JSs intercellulaires après une IR systémique est confirmé par une augmentation de la perméabilité au bleu d'Evans et à la fluorescéine de sodium, ainsi que par une diminution de l'expression de la protéine ZO-1 après un CH (174).

L'ischémie augmente aussi l'expression de protéines d'adhésion des cellules inflammatoires systémiques. Le choc hémorragique seul n'a pas d'effets marqués sur la perméabilité de la BHE aux cellules inflammatoires circulantes. Lors d'un choc hémorragique décompensé (comme dans notre modèle), les niveaux sériques de la protéine ICAM-1 sont augmentés, mais elle n'est pas augmentée au niveau du cerveau (175). Par contre, l'IL-1 β produite dans le cerveau après l'IR favorise le recrutement de cellules inflammatoires systémiques en augmentant l'expression de ICAM-1 et VCAM (159). La sécrétion d'IL-1 β par l'inflammasome NLRP3, secondaire à son activation par l'AU, est donc une hypothèse plausible (176).

L'AU pourrait aussi avoir une influence sur la perméabilité de la BHE à cause de son implication dans la dysfonction endothéliale qui est fréquemment observée dans les maladies cardiovasculaires (177–180). Les maladies cardiovasculaires sont reconnues pour être concomitantes avec une hyperuricémie (179). Un des mécanisme est que l'AU diminue la circulation de l'oxide nitrique (NO) (180). Une diminution de la sécrétion de facteurs vasorelaxants tels que le NO par l'endothélium favorise la vasoconstriction et la réponse inflammatoire (56). *In vitro*, l'AU augmente l'expression de ICAM-1 par les cellules endothéliales (170). De plus, une étude effectuée dans un modèle d'hyperuricémie dans le syndrome métabolique, a démontré que l'AU pouvait passer la BHE et stimuler la réponse inflammatoire dans le cerveau (181).

1.5 **Hypothèse et objectifs**

Notre hypothèse est que le CH entraîne directement une hausse des niveaux sanguins d'AU augmentant la perméabilité de la BHE et favorise l'apoptose cérébrale et la neuroinflammation. Notre hypothèse secondaire est qu'étant donné la sensibilité de l'amygdale et de l'hippocampe à l'ischémie, l'anxiété et la dépression se développent suite au CH ce qui peut être atténué par la destruction de l'AU circulant à l'aide d'une uricase.

Nos objectifs sont d'abord de déterminer si l'AU altère la perméabilité de la BHE suite au CH. Par la suite, nous allons caractériser l'impact de l'AU sur l'apoptose et la présence de neuroinflammation dans le SNC. Finalement, nous allons évaluer le rôle de l'AU circulant sur le comportement, particulièrement l'anxiété, suite au CH. Pour atteindre ces objectifs, nous utilisons un modèle murin de choc hémorragique contrôlé décrit ci-dessous.

La méthodologie de la procédure chirurgicale ainsi que les tests biochimiques et comportementaux utilisés seront détaillés dans la section suivante.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Modèle animal

Le modèle utilisé est le rat Wistar mâle (*Rattus Norvegicus*) pesant entre 400-450 g obtenu de Charles River Laboratories (Montréal, Canada). Les animaux sont hébergés en suivant les lignes directrices du « Canadian Council on Animal Care ». Les expérimentations sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique animale de l'Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal (protocoles CHAE.04 et CHAE.06). Les animaux sont conservés dans des conditions stables (température 21-22 °C, humidité de 40-50% et cycles noirceur/lumière 12/12 heures constants). Les rats ont accès *ad libidum* à la nourriture et l'eau et ont 3 jours d'acclimatation avant d'être assigné à un groupe expérimental.

Pour atteindre nos objectifs, 90 animaux sont utilisés. Ils sont aléatoirement assignés à un groupe expérimental. Nos groupes sont : un groupe contrôle (SHAM), un groupe contrôle avec injection extrinsèque d'AU (250 mg/kg dissout dans NS) (SHAM+AU), un groupe de choc hémorragique (CH) et un groupe de CH avec injection d'une uricase (Fasturtec Rasburicase, Sanofi-Aventis; dose : 1.5 mg/kg) au moment de la reperfusion (CH+U). Après la chirurgie, les rats sont gardés sous observation pour 72 h afin de permettre des analyses biochimiques du cerveau ou pour 2 semaines pour évaluer le comportement. Aucun rat n'a été perdu au cours des chirurgies ou avant le moment de leur sacrifice.

2.2 Procédures chirurgicales

Pour l'induction du CH, les rats sont d'abord anesthésiés avec 70 mg/kg de kétamine (Narketan 10 mg/ml, Vetoquinol) et 15 mg/kg de xylazine (Xylamax 100 mg/ml, Bimeda). Les rats sont par la suite intubés et mis sous respirateur (RoVent, Kent Scientific) pour ventilation avec un volume de 6 ml/kg, avec de l'oxygène et 1-2% d'isoflurane (Baxter). Les rats sont aussi placés sur une table branchée à une pompe thermique (HTP-1500) afin d'assurer le maintien de leur température corporelle à environ 37 °C durant la période d'anesthésie. Après l'application locale de lidocaïne au niveau fémoral, des canules (Tubing PE50 et PE10; # cat. 51158 et 51150; Stoelting, USA) sont insérées et fixées dans la veine fémorale (prélèvements sanguins et

reperfusion) et dans l'artère fémorale (mesure de la pression artérielle). Le suivi de la pression artérielle est effectué à l'aide d'une sonde à pression branchée à la canule artérielle et du logiciel Spike 2.0 (Signal Hound). La température par une sonde rectale connectée à un lecteur de température (Thermalert Model TH-8, Physitemp), la saturation en O₂ et le nombre de battements par minutes (bpm) sont aussi mesurés tout au long de la chirurgie à l'aide d'un Vet/Ox G2Digital (HESKA).

Pour l'induction du CH, du sang est prélevé par la canule veineuse jusqu'à l'atteinte d'une pression de 30 mm Hg. Cette pression est maintenue durant 1 heure par le retrait, de bolus de sang additionnels pour lutter contre la compensation physiologique. Le sang retiré titré avec du citrate pour éviter la coagulation sanguine, puis mélangé à un ratio 1 :1 avec du LR et conservé dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à la reperfusion. Les rats sont reperfusés avec leur propre sang mélangé avec du LR en bolus de 1-2 ml jusqu'à l'atteinte d'une pression stable à 60 mm de Hg (environ 45 minutes). Environ 85-100% du sang prélevé est retourné aux rats avec un volume additionnel de 3 mL de NS. Pour le groupe CH+U, l'uricase est administrée par voie IP (intrapéritonéale) après l'injection du premier bolus sanguin de reperfusion. Pour le groupe SHAM+AU, l'AU est administrée par voie IP après la canulation, mais aucun prélèvement sanguin n'est effectué. Une injection sous-cutanée (SC) d'analgésique (buprénorphine (Vetergesic 0.3 mg/ml) 2 mg/kg) est effectuée au moment du réveil et 2 injections le lendemain de la chirurgie (à 12h et 24h de reperfusion). 24 heures, 72 heures ou 3 semaines après la chirurgie les rats sont anesthésiés de nouveau avec la kétamine (80 mg/kg) et la xylazine (10 mg/kg) et sacrifiés par décapitation.

2.3 Récupération des échantillons

Le sang est récupéré dans des tubes contenant de l'EDTA au moment du sacrifice, soit à 24 h, 72 h ou à 3 semaines, et conservé sur glace. Il est par la suite centrifugé à 3 000 g (15 minutes à 4°C) pour isoler le plasma qui est aliquoté (1.5 ml), congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C. Au moment de l'euthanasie, les cerveaux sont aussi récupérés. Dans un hémisphère du cerveau, on isole l'amygdale (A) et l'hippocampe (H) pour scan de la fluorescence émise par la NaF et analyses biochimiques. Les échantillons pour analyses biochimiques sont congelés

dans l'azote liquide et conservés à -80 °C afin d'assurer un maintien de la structure protéique. L'autre hémisphère du cerveau est placé dans une solution de fixation (TissuFix, Chaptec) pour 24h avant d'être transféré à une solution de 30% de sucrose dans du PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7) pour 72h pour cryopréservation avant la congélation pour coupes au cryostat (Thermo Scientific, Microm HM525 NX Cryostat, 956641) et colorations par immunofluorescence (IF).

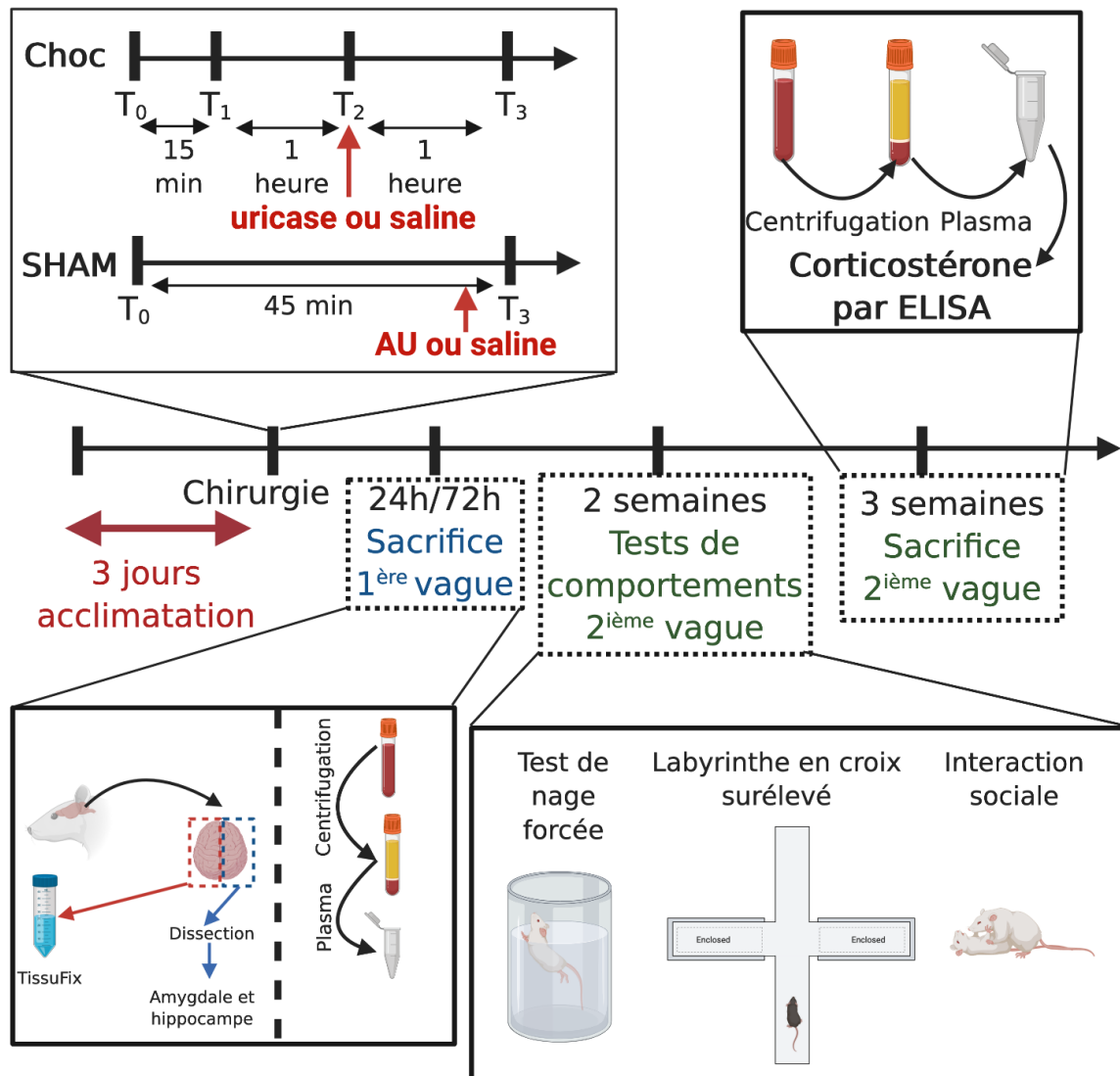


Figure 2. Procédures expérimentales.

Ligne du temps représentant le dessin expérimental ainsi que les différents échantillons collectés et les mesures prises au fil du temps. Pour le CH, T₀ représente le moment où le rat est canulé, T₁ le moment où la pression de 30 mm Hg est atteinte pour la première fois, T₂ la fin de la période de choc et T₃ la fin de la reperfusion. L'uricase est administrée à T₂.

2.4 Dosage de la concentration d'acide urique plasmatique et dans le cerveau

L'acide urique est dosé dans le plasma à 24 h et 72 h de reperfusion et dans cerveau (amygdale et hippocampe) à 72 h de reperfusion en duplicata. Pour le plasma, les échantillons sont directement chargés dans une plaque de 96 puits pour l'essai enzymatique. Les tissus de cerveaux (amygdale (A) et hippocampe (H)) sont homogénéisés par sonification dans un tampon de lyse (tampon MAPK: (20% Mix 5X pH 7.5 (50 mM Tris-HCl, 20 mM β -Glycérophosphate, 20 mM de sodium fluoride, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4), 1.6×10^{-3} M de benzamidine, 2.5 M de PMSF 0.2 M, 1M de Leupeptine 10 mg/mL, 5 M de DTT 1M, 1M de microcystine 1mM, 100M de Triton X-100 10 %), incubés pour 30 minutes sous agitation sur glace puis centrifugés à 13 000 g (15 minutes à 4°C) pour éliminer les débris cellulaires. La quantité de protéines dans les surnageants ainsi obtenus est dosée par la méthode de Lowry afin d'obtenir le volume nécessaire pour 200 μg de protéines pour chaque échantillon. Les échantillons sont préparés dans du « Assay Buffer » pour un volume total de 50 μL et chargés dans une plaque de 96 puits. La concentration d'AU est mesurée en suivant le protocole fourni par le fabricant (STA-375 400 assays, Cell Biolabs Inc.).

2.5 Mesure de l'altération de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique

2.5.1 *Pénétration de la fluorescéine de sodium au niveau du parenchyme cérébral*

Une heure avant le sacrifice, 0.5 ml d'une solution de 10% de fluorescéine de sodium (NaF) est injectée par voie IP aux rats. La NaF diffuse dans la circulation sanguine à partir de la cavité abdominale. Elle peut, par la suite, circuler dans le rat durant 1 h. Si la perméabilité de la BHE est altérée, la NaF pourra pénétrer dans le cerveau (172). Au moment du sacrifice, une partie du plasma récolté est conservé pour doser la fluorescence et assurer une circulation constante de NaF entre les groupes. Par la suite, les cerveaux sont récoltés en disséquant l'amygdale et l'hippocampe qui sont imagés avec un scan Li-Cor Odyssey-CLX. La fluorescence est dosée à l'aide du logiciel ImageStudio 3.1 (Li-Cor) permettant de quantifier la diffusion de la NaF dans le cerveau en tenant compte de la surface étudiée.

2.5.2 Western Blot pour expression de ICAM-1

2.5.2.1 Lyse tissulaire et extraction protéique

Les échantillons de cerveau (amygdale (A) et hippocampe (H)) sont homogénéisés par sonification dans du tampon MAPK puis incubés sur glace sous agitation pendant 30 minutes puis centrifugés à 13 000 g (15 minutes à 4 °C) pour éliminer les débris cellulaires. La quantité de protéines dans les surnageants obtenus est dosée avec la méthode de Lowry. Le dosage des protéines permet d'uniformiser nos données en chargeant une concentration finale de protéine de 100 µg dans tous nos puits. Le volume requis de protéines est ajusté aux échantillons, mélangé avec le tampon de chargement (orange 4X protein buffer de Mandel Scientific) et le volume est complété avec du tampon MAPK pour l'obtention d'un volume total de 40 µL à charger dans les puits du gel. Une échelle de poids moléculaire (PM; BLUelf Prestained Protein Ladder FroggaBio) est aussi chargée dans chaque gel afin de faciliter l'identification des bandes protéiques en fonction de leur poids moléculaire.

2.5.2.2 Migration de protéines et transfert sur membrane de nitrocellulose

Les gels (« running gel ») utilisés pour la séparation des protéines contiennent 10% d'acrylamide (Acrylamide 30% - Bisacrylamide 0.8%, Tris 0.72M pH 8.8, SDS 10%, APS (ammonium persulfate) 1%, 5 µL de Tetramethylethylenediamine (Temed)) et sont coulés dans un montage pour Western Blot (Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad). Pour linéariser les protéines avant la séparation un « stacking gel » contenant 6% d'acrylamide a été préparé (Acrylamide 30 % - Bisacrylamide 0.8 %, Tris 0.72 M pH 8.8, SDS 10%, APS 1%, 5 µL de Temed), coulé sur le « running gel » déjà polymérisé et un peigne est placé pour définir les puits. Lorsque les gels sont polymérisés, ils sont transférés dans une cuve d'électrophorèse, la cuve est remplie avec du tampon de migration 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄) et les échantillons sont chargés dans les puits. La migration est effectuée à 150 V pour environ 1 heure ou jusqu'à l'atteinte d'une séparation protéique adéquate. Les protéines sont par la suite transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du système à sec TurboBlot de BioRad dans du tampon de transfert (5.82 g/L de Tris-Base, 2.93 g/L de glycine, 3.75 ml/L de SDS 10 %, 200 ml/L de méthanol, complété avec de l'eau distillée).

2.5.2.3 Révélation spécifique à la protéine ICAM-1

La détection de la protéine ICAM-1 est effectuée à l'aide du système SNAP i.d. 2.0 (Millipore, Etobicoke, Ontario, Canada). Les sites non-spécifiques sont bloqués pour 20 minutes sous agitation dans du Odyssey Blocking Buffer (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) ratio (1:1) avec PBS 1X. Tous les anticorps sont dilués dans un mélange à ratio 1:1 de Blocking Buffer et PBS 1X contenant 0.2% de Tween 20. La membrane est ensuite incubée pour 15 minutes sous agitation avec l'anticorps primaire (1:1000) ICAM-1 (lapin anti-ICAM-1 Antibody, Invitrogen, MA5407). L'excès d'anticorps non-lié est lavé avec du PBS. Les membranes sont par la suite incubées 10 minutes sous agitation avec l'anticorps secondaire (chèvre anti-souris IRDye 800CW, Li-Cor). Ensuite, la membrane est lavée avec une solution de 1% de Tween 20 dans du PBS. Les membranes sont séchées à 37 °C pour 5 minutes et lues dans le scan Odyssey CLX de Li-Cor. L'intensité des bandes lumineuses est quantifiée à l'aide du logiciel Image Studio 3.1. Par la suite, les membranes sont placées dans du « stripping buffer » (100 mM de glycine, 1% de SDS, pH 2) pour 1 h sous agitation pour retirer les anticorps.

Afin de normaliser la quantité de protéines dans chaque puits, l'actine est utilisée comme protéine de référence. Les anticorps utilisés sont l'anti-actine (lapin, Sigma, A2066) pour le primaire et l'anti-lapin (anti-lapin IRDye 800CW Li-Cor) pour l'anticorps secondaire.

2.6 Mesure de la neuroinflammation

2.6.1 Dosage de l'activité de la myéloperoxydase

Les échantillons de cerveaux (A et H) sont pesés et lysés par sonification dans 250 µL d'une solution de bromide d'hexadecyltrimethylammonium (HTAB) (0.5% HTAB 50 mM, pH 6.0). Les tissus sont ensuite soumis à 3 cycles de gel (azote liquide) et dégel (37 °C). Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés à 20 000 g durant 15 minutes à 4 °C.

Pour mesurer l'activité de la MPO, 0.1 mL de surnageant est ajouté à 2.9 mL d'une solution de sodium de phosphate 50 mM (0.167 mg/mL chlorhydrate d'o-dianisidine, pH 6.0 et 0.0005% de peroxyde d'hydrogène). L'absorbance de la solution obtenue est mesurée par spectrophotométrie (Varian-Cary 50 Bio) à une longueur d'onde de 460 nm à chaque 10 secondes pour une durée totale de 2 minutes. L'estimation de l'activité de la myéloperoxydase

(accumulation des neutrophiles) est obtenue à partir du calcul suivant : ((absorbance maximale-minimale / poids de l'échantillon (g)) / 2). L'activité de la MPO pourrait être associée à d'autres types cellulaires comme les macrophages. La technique utilisée ici a été validée comme corrélant l'activité de la MPO et l'infiltration par les neutrophiles dans le tissu (182).

2.6.2 Dosage de l'activation des cellules inflammatoires cérébrales : astrocytes et microglie

2.6.2.1 Western Blot pour expression de GFAP et Iba1

La procédure utilisée pour la lyse, la migration, le transfert et la révélation des protéines d'intérêt est la même que pour la protéine ICAM-1. Par contre, afin de permettre la séparation adéquate de Iba1 qui a un faible poids moléculaire (17 kDa) un gel contenant 15% d'acrylamide est utilisé. Les anticorps primaires utilisés sont pour GFAP (lapin, GFAP Antibody, Invitrogen, PA1-10019) et pour Iba1 (lapin, anti-Iba1, Wako Chemicals, 019-19741). L'anticorps secondaire est le même que pour la détection de l'actine. L'analyse de la concentration protéique se fait de la même façon que pour ICAM-1.

2.6.2.2 Immunofluorescence

2.6.2.2.1 Fixation des tissus de cerveau et cryopréservation

Au moment de la collecte des échantillons un hémisphère du cerveau est placé dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) (TissueFix, Chaptec) pour un minimum de 24 h à 4 °C. Par la suite, les tissus sont placés pour un minimum 36 h dans une solution de 30% de sucrose dans du PBS 1X à 4 °C pour cryopréservation. Finalement, les tissus sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -20 °C jusqu'au moment des coupes.

2.6.2.2.2 Coupes de tissus au cryostat et montage sur lames

Pour permettre l'étude de la neuroinflammation dans le parenchyme cérébral par immunohistochimie et coloration directe, un hémisphère cérébral de rats SHAM, CH et CH+U sont coupés en sections fines de 15 µm avec un cryostat à une température de -17 °C. Les échantillons sont montés sur le support du cryostat à l'aide de colle Neg-50 (Richard Allan Scientific). Les coupes sont déposées sur des lames de microscopie Fisherfinest Premium microscope slides frosted (Fisher Scientific) et conservées à -80 °C jusqu'à leur coloration.

2.6.2.2.3 Immunohistochimie

Les tissus sont fixés avec une solution de 4% de PFA pour 10 minutes. Les membranes cellulaires sont ensuite perméabilisées au Triton X 100 10% dans du PBS pour 10 minutes. Les sites non-spécifiques sont saturés dans du « Blocking Buffer » (BB; PBS+NGS 10%+BSA (albumine sérique de bœuf; Sigma) 10%) pour 45 minutes. Toutes les dilutions d'anticorps primaire et secondaire sont faites dans le BB. Pour la cicatrisation par les astroglies, la protéine GFAP (1:1000; anticorps de lapin; ThermoFisher Scientific) ainsi que la protéine NeuN (marquage des neurones) (1:1000; anticorps de souris; EMD Milipore) spécifique aux neurones sont marqués. L'anticorps secondaire utilisé pour GFAP est un anti-lapin couplé au fluorochrome 488 (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific). Pour NeuN un anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome 568 (Molecular Probes ; ThermoFisher Scientific) est utilisé. Pour l'étude l'inflammation par la microglie un anticorps primaire dirigé contre la protéine Iba1 est utilisé (1:600; anticorps de lapin; Wako Bioscience). Les marquages sont révélés à l'aide du même anticorps secondaire que celui utilisé pour GFAP. Les noyaux cellulaires sont contre-colorés à l'aide du DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride; Sigma-Aldrich). Les lamelles sont montées sur les lames avec du ProLong Gold antifade (ThermoFisher). Les images (10 par coupes) sont prises à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss Axio Imager 2 Upright microscope avec un objectif 40X.

Les analyses quantitatives sont effectuées à l'aide du logiciel ImageJ. Pour les astrocytes, un pourcentage de la surface occupée par la coloration GFAP et NeuN est appliqué. Pour la microglie, la quantité de cellules positives sur le nombre de cellules totales est comptée.

2.6.2.3 IL-1 β dans le cerveau

L'IL-1 β est dosée par « enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA) dans des lysats protéiques obtenus par la même technique que décrite dans la section Western Blot. Un dosage par la méthode de Lowry nous permet d'obtenir le volume nécessaire pour 200 μ g de protéines. Les échantillons sont par la suite préparés dans du « Reagent Diluent » spécifique à l'ELISA. La concentration d'IL-1 β dans les échantillons est mesurée en suivant les directives du fabricant « rat IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA » (R&D Biosystems; DY501).

2.7 Mesure de l'apoptose dans le cerveau

2.7.1 *Activité de la caspase-3*

Pour mesurer l'activité de la caspase-3 (C3) dans l'amygdale et l'hippocampe nous avons utilisé un essai enzymatique par spectrofluorométrie tel que décrit dans une publication du laboratoire mesurant l'effet de l'AU sur l'apoptose dans les organes à la suite du CH (7). Les protéines cytosoliques sont extraites à partir d'échantillons de cerveau (A et H) par sonification dans du tampon de lyse cellulaire ((1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 10 mmol/mL Tris [pH 8.0], 5 mmol/mL ethylenediamine tetraacetate, 2 mmol/mL DL-1,4-dithiothreitol (DTT), 1 mmol/mL phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 10 mg/mL Leupeptine, 10 mg/mL Pepstatine A, 10g/mL Aprotinine). Les protéines sont par la suite dosées par la méthode de Bradford afin d'obtenir une quantité de protéine (25 µg) équivalente dans chaque tube d'essai enzymatique. L'essai est effectué en triplicata dans un tampon de réaction (50 mmol/mL Tris [pH 7.5], 5 mmol/mL MgCl₂, 1 mmol/mL ethylene glycol bis-2-aminoethyl ether-N,N',N,n'-tetraacetic acid, 0.1% 3[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1 mmol/mL DTT). Pour l'essai enzymatique, on vient calculer un ratio de caspase-3 active sur la quantité totale de caspase-3 dans l'échantillon mesuré. Pour ce faire, on utilise un substrat fluorogénique spécifique à la C3 (DEVD-AMC, Enzo Life Sciences) qui se lie au site actif de toutes les C3 présentes qu'elles soient actives ou non, de cette manière on peut connaître la quantité totale de C3. Pour mesurer la quantité de C3 active on ajoute un inhibiteur venant se lier aux C3 inactives (DEVD-CHO, Enzo Life Sciences). Bref, on obtient pour chaque lysat cellulaire un triplicata négatif (AMC seulement) et un triplicata positif (AMC et CHO). Les tubes contenant les protéines et les substrats sont incubés à 37°C pour 3 heures et la fluorescence est mesurée à un ratio de 365 nm d'excitation sur 465 nm d'émission dans des cuvettes de verres à l'aide d'un spectrofluoromètre (DeltaRAM High Speed Multiwavelength Illuminator, Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA). Les données sont par la suite regroupées par triplicata en faisant la moyenne et un ratio d'essais positifs sur essais négatifs nous donnant un taux d'activité de la C3 pour chaque échantillon. Les données sont par la suite normalisées en pourcentage du groupe contrôle (SHAM).

2.7.2 Coloration TUNEL

Les coupes utilisées pour cette coloration ont été faites en suivant le protocole décrit dans la section immunohistochimie. La coloration TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling) permet de détecter les cellules apoptotiques dans le cerveau en suivant le protocole fourni par le fournisseur (FragEL DNA Fragmentation kit fluorescent Tdt-enzyme, Sigma Aldrich). Les noyaux totaux sont contre-colorés avec le DAPI.

Pour les analyses quantitatives, le logiciel ImageJ est utilisé pour compter le nombre total de noyaux (DAPI) pour 10 champs à grossissement 40X par animaux et le nombre de cellules TUNEL positives. Un ratio pour déterminer le pourcentage de cellules TUNEL positives sur le nombre total de cellules est par la suite appliqué.

2.7.3 Immunofluorescence

Pour confirmer si la mort cellulaire touche bel et bien les neurones dans le cerveau, nous avons effectué une co-coloration par immunofluorescence entre la protéine NeuN et la coloration au fluorojade (FJ) qui marque les neurones en dégénérescence. La méthodologie pour la préparation des tissus et l'immunofluorescence pour NeuN est la même que décrite précédemment. La méthodologie utilisée pour la coloration au FJ est décrite ci-dessous. Les analyses d'images par immunofluorescence sont effectuées à l'aide du logiciel ImageJ.

2.7.3.1 Coloration au fluorojade

Pour la coloration au FJ, des coupes de tissus, effectuées en suivant le protocole préalablement décrit, sont d'abord trempées dans de l'éthanol 70% (HistoPrep Alcool 100%, Fisher Scientific; dilué dans eau distillée) puis rincée dans l'eau distillée. La lame est par la suite placée dans un vase d'histologie contenant une solution de 0.06% de permanganate de potassium dans l'eau distillée durant 10 minutes sous agitation. La lame est ensuite rincée pour 2 minutes dans l'eau distillée et placée dans la solution de coloration de FJ (5% de solution stock (10% de Fluorojade (FluoroJade C, AG325, Sigma-Aldrich) dans l'eau distillée) dans solution de 0.1% d'acide acétique pur) durant 15 minutes. Les lames sont ensuite rincées 3 fois dans l'eau distillée. Cette coloration est suivie de l'immunohistochimie pour NeuN pour comparer les neurones en dégénérescence aux neurones totaux.

2.8 Tests de comportement

Tous les tests de comportements ont été réalisés à l'aveugle par le même expérimentateur, ne connaissant pas l'appartenance aux groupes des rats. La pièce où les tests ont été réalisés est à l'abri des bruits environnants. Les tests sont effectués 2 semaines après la chirurgie afin de permettre aux rats de récupérer.

2.8.1 *Test de labyrinthe en croix surélevé*

Le test du labyrinthe en croix surélevé est effectué avec un montage Panlab (Elevated Plus Maze rat, 76-1121). Le rat est placé au centre du labyrinthe et des mesures sont prises sur une durée de 5 minutes. Un expérimentateur note le nombre de passages dans les branches ouvertes et fermées ainsi que le temps passé dans les branches.

2.8.2 *Test de nage forcée*

Le test de nage forcée est effectué dans des cylindres transparents (Panlab, 76-0472) de 30 cm de profondeur rempli au 3/4 avec de l'eau à température entre 15 et 20 °C. Le test s'effectue sur 2 journées. La première journée est consacrée à l'habituation, c'est-à-dire à 15 minutes de nage dans le cylindre. Le lendemain, les rats sont placés dans le cylindre durant 5 minutes, il s'agit du test. Tous les tests sont filmés et le temps d'immobilité (dépression), la latence à la première immobilité et d'échappement sont chronométrés sur vidéo.

2.8.3 *Test d'interaction sociale*

Deux rats, indépendamment du groupe expérimental, sont placés dans une nouvelle cage vide et propre pour 10 minutes. Pendant cette période, 2 expérimentateurs, ne connaissant pas les groupes auxquels appartiennent les rats, mesurent le comportement d'un rat à l'aveugle. Les facteurs mesurés sont le temps d'interaction (un rat sent, touche ou toilette l'autre rat), le nombre de redressements sur 2 pattes (exploration) et le nombre de toilettages (signe d'inconfort).

2.9 Dosage de la corticostérone plasmatique

Le dosage de la corticostérone plasmatique pour les rats à 3 semaines de reperfusion (n=8/groupe) est effectué à l'aide d'un ELISA spécifique pour le rat (Enzo LifeSciences, ADI-900-097). Les échantillons de plasmas sont dilués 1:10 dans du « Assay Buffer » avant d'être chargés dans la plaque.

2.10 Statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel SPSS Statistics (IBM Corp). Les graphiques présentés sont faits à l'aide du logiciel Prism 8 (GraphPad Software Inc.). Lorsque les groupes SHAM et SHAM+AU sont comparés, un test d'ANOVA simple est réalisé pour comparer les deux groupes sans test post-hoc avec un seuil de $p < 0.05$. Des tests d'ANOVA simples avec tests post-hoc de Bonferroni ou de Games-Howell en fonction de l'homogénéité des variances, sont utilisées dans toutes les analyses comparant les groupes SHAM, CH et CH+U avec un seuil de significativité à $p < 0.05$. De plus, des tests de corrélation de Pearson nous permettent d'établir des connexions entre nos variables. Pour la coloration TUNEL, un test Khi-carré est utilisé avec partitions selon Siegel et Castellan pour distinguer les différences spécifiques entre les groupes avec un seuil de significativité à $p < 0.05$.

3 Résultats

3.1 Données hémodynamiques

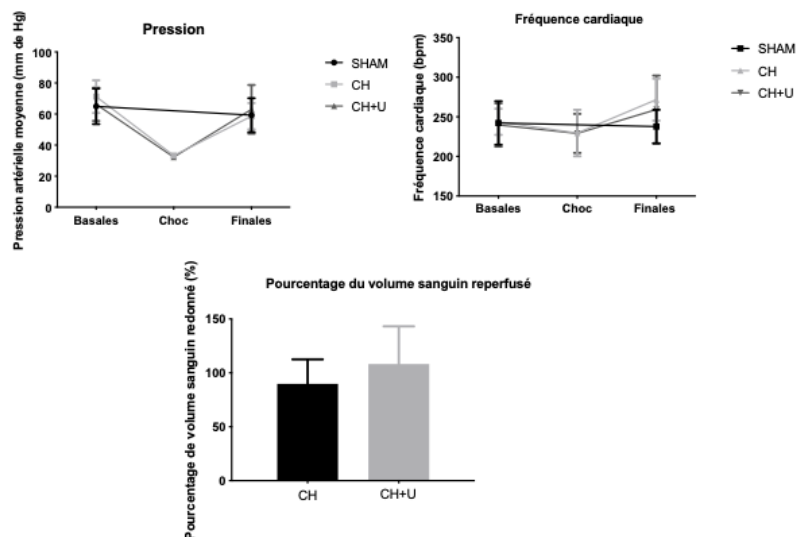


Figure 3. Données hémodynamiques et pourcentage du volume sanguin utilisé pour la reperfusion.

Données hémodynamiques (pression sanguine moyenne, fréquence cardiaque et le pourcentage de volume sanguin reperfusé) pour SHAM (n= 17), CH (n= 17) et CH+U (n= 16). Basales : canulé sans prélèvement sanguin; Choc : pression de 30 mm Hg induite par prélèvements sanguins ; Finales : reperfusion terminée retour à la pression initiale (après 2h).

La pression artérielle initiale moyenne est uniforme dans tous les groupes avec une pression de (64.99 ± 11.47) mmHg pour le groupe SHAM, de (71.19 ± 10.49) mmHg pour le groupe CH et de (66.33 ± 10.73) mmHg pour le groupe CH+U. Le rythme cardiaque est de (242.22 ± 27.60) bpm (battements par minute) pour le groupe SHAM, de (243.71 ± 16.54) bpm pour le groupe CH et de (239.81 ± 27.34) bpm pour le groupe CH+U. Durant le choc, les données de pression sont uniformes pour les groupes CH (33.29 ± 1.73) mmHg et CH+U (32.33 ± 1.54) mmHg. Il en est de même pour le rythme cardiaque entre les groupes CH (229.55 ± 29.32) bpm et CH+U (229.10 ± 24.73) bpm. De plus, le pourcentage de sang redonné pour la reperfusion entre les groupes CH $(89.78 \pm 22.74)\%$ et CH+U $(108.19 \pm 35.01)\%$. Les données finales de pression sont aussi uniformes dans les groupes SHAM (59.33 ± 10.99) mmHg, CH (58.65 ± 8.42) mmHg et CH+U (63.04 ± 15.70) mmHg. Il en est de même pour le rythme cardiaque avec SHAM (237.72 ± 21.25) bpm, CH (271.82 ± 26.59) bpm et CH+U (259.25 ± 42.78) bpm.

3.2 Circulation d'AU et passage au cerveau

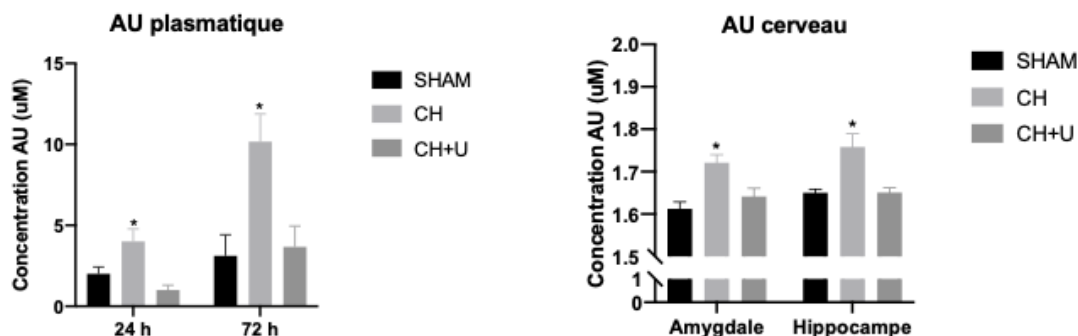


Figure 4. L'acide urique augmente au niveau plasmatique cérébral après le choc hémorragique.

Données de dosage de la concentration d'acide urique par essai fluorimétrique dans le plasma (24 et 72 heures de reperfusion) ainsi que dans l'amygdale et l'hippocampe pour les groupes SHAM (n= 7), SHAM+AU (n=8); CH (n= 7) et CH+U (n= 7). *Bonferonni (p<0.05) en comparaison à SHAM et CH+U.

Nous avons d'abord dosé l'AU plasmatique afin de confirmer qu'il est bien augmenté en circulation pour le groupe CH. À 24 heures de reperfusion, on observe une augmentation significative de l'AU plasmatique ($F(2,14)=7.62$; $p<0.05$) pour le groupe CH (4.00 ± 0.78) µM en comparaison au groupes SHAM (2.00 ± 0.74) µM et CH+U (1.00 ± 0.31) µM. La même chose est observée à 72 heures de reperfusion avec CH (10.17 ± 1.71) µM significativement plus élevé ($F(2,12)=6.36$; $p<0.05$) que SHAM (3.12 ± 1.31) µM et CH+U (3.67 ± 1.29) µM (Figure 4).

Au niveau de l'amygdale et de l'hippocampe, nous avons des résultats similaires pour la concentration d'AU. Pour l'amygdale, le groupe CH (1.72 ± 0.02) µM est significativement ($F(2,18)=9.70$; $p<0.05$) que les groupes SHAM (1.61 ± 0.02) µM et CH+U (1.64 ± 0.02) µM. Pour l'hippocampe, le résultat est le même avec CH (1.75 ± 0.03) µM significativement plus élevé en comparaison au groupe SHAM (1.65 ± 0.01) µM et CH+U (1.65 ± 0.01) µM (Figure 4).

3.3 Altération de la perméabilité de la BHE

3.3.1 Fluorescéine de sodium

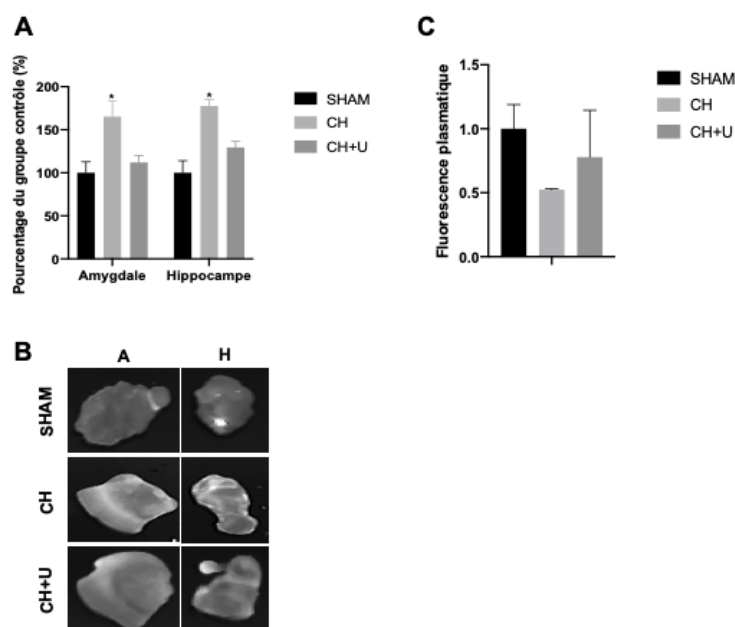


Figure 5. Le traitement avec l'uricase prévient une augmentation de la perméabilité à la fluorescéine de sodium après le choc hémorragique.

A. Scan de fluorescence pour la fluorescéine de sodium dans l'amygdale et l'hippocampe pour les groupes SHAM, CH et CH+U. A : amygdale; H : hippocampe.

B. Représentation graphique de la quantification de la fluorescence dans l'hippocampe et l'amygdale pour les groupes SHAM (n=5), CH (n=5) et CH+U (n=7). *Bonferroni ($p < 0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

C. Dosage plasmatique de la NaF à l'aide d'un spectrofluoromètre. ($p \geq 0.05$)

Pour mesurer l'altération de la perméabilité de la BHE au niveau de l'amygdale et l'hippocampe, la concentration de NaF dans ces régions a été dosée. Au niveau de l'amygdale la fluorescence est significativement ($F(2,15)=8.16$; $p < 0.05$) augmentée dans le groupe CH ($100.0 \pm 12.8\%$) en comparaison au groupe SHAM ($165.2 \pm 18.5\%$) et au groupe CH+U ($112.2 \pm 7.9\%$). La même tendance est observée pour l'hippocampe avec CH ($100 \pm 14.1\%$) significativement ($F(2,14)=16.46$; $p < 0.05$) plus élevée que SHAM ($177.5 \pm 7.6\%$) et CH+U ($129.5 \pm 6.9\%$). Les données sont rapportées en pourcentage du groupe SHAM (Figure 3).

De plus, nous n'observons aucune différence significative entre les groupes pour le dosage de la NaF plasmatique ($p \geq 0.05$).

3.3.2 Expression ICAM-1 et infiltration par neutrophiles après le CH

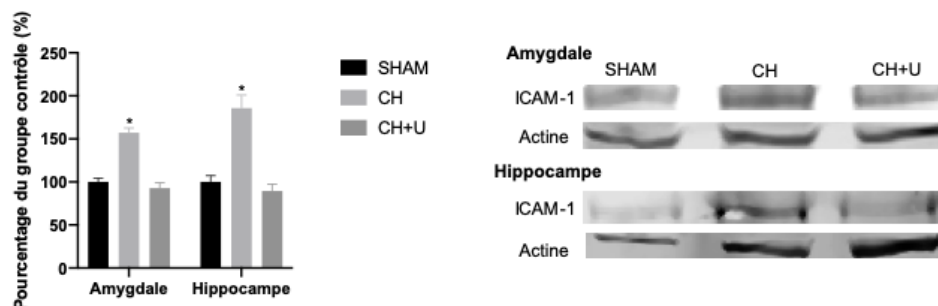


Figure 6. Le traitement avec une uricase prévient une augmentation de l'expression de ICAM-1.

Dosage de la concentration d'ICAM-1 dans l'amygdale et l'hippocampe par Western Blot dans le groupe SHAM (n=4), CH (n=4) et CH+U (n=4) 72h après la chirurgie. *Bonferroni ($p < 0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

Après 72 h de reperfusion, dans l'amygdale, on observe une augmentation significative ($F(2,31)=42.18$; $p < 0.05$) de l'expression de ICAM-1 dans le groupe CH ($157.21 \pm 5.49\%$) en comparaison au groupes SHAM ($100.00 \pm 4.57\%$) et CH+U ($92.72 \pm 6.32\%$). Le même phénomène ($F(2,25)=24.31$; $p < 0.05$) est observé au niveau de l'hippocampe avec CH ($185.78 \pm 15.24\%$) en comparaison à SHAM ($100.00 \pm 7.452\%$) et à CH+U ($89.53 \pm 7.87\%$) (Figure 5). Les données sont exprimées en pourcentage du groupe SHAM.

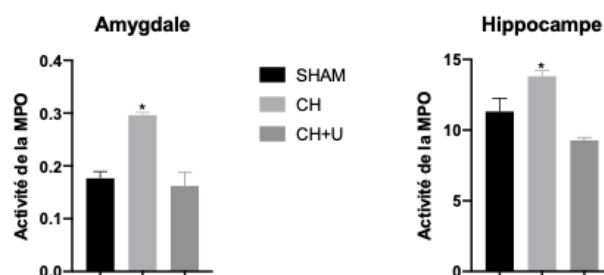


Figure 7. L'uricase prévient l'infiltration par les neutrophiles au niveau cérébral.

Dosage de l'activité de la MPO dans l'amygdale et l'hippocampe dans le groupe SHAM (n=5), CH (n=6) et CH+U (n=5) 72h après la chirurgie. *Bonferroni ($p < 0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

À 72 heures de reperfusion, dans l'amygdale, l'activité de la MPO dans le groupe CH (0.296 ± 0.01) est significativement ($F(2,11)=24.26$; $p < 0.05$) plus élevée que celle dans les groupes SHAM (0.177 ± 0.01) et CH+U (0.162 ± 0.03). Le même phénomène est observé pour l'hippocampe dans laquelle l'activité de la MPO dans le groupe CH (13.803 ± 0.413) est significativement ($F(2,12)=21.09$; $p < 0.05$) plus élevé que les groupes SHAM (11.313 ± 0.934) et CH+U (9.277 ± 0.197) (Figure 6).

De plus, au niveau de l'amygdale, une corrélation est établie entre l'expression de ICAM-1 (Figure 5) et l'activité de la MPO (Figure 6). Un test de Pearson $r=0.759$; $p\leq 0.05$ nous permet de déterminer que plus l'expression de ICAM-1 augmente plus l'activité de MPO augmente. Au niveau de l'hippocampe, le test de Pearson ($r=0.829$; $p\leq 0.05$) permet d'observer la même corrélation qu'au niveau de l'amygdale.

3.3.3 Expression ICAM-1 et infiltration par neutrophiles suite à l'injection d'AU exogène en l'absence de choc hémorragique

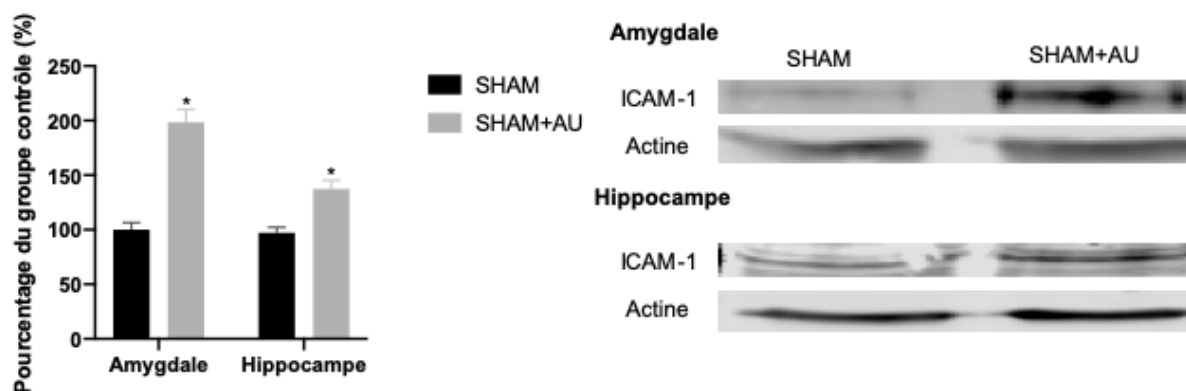


Figure 8. L'acide urique exogène augmente l'expression de ICAM-1.

Dosage de la concentration d'ICAM-1 dans l'amygdale et l'hippocampe par Western Blot dans le groupe SHAM (n=4) et SHAM+AU (n=4) 24h après la chirurgie * ($p<0.05$).

Notre analyse de l'expression de ICAM-1 dans l'amygdale montre une augmentation significative ($F(1,24)=57.40$; $p<0.05$) de l'expression de cette protéine dans le groupe SHAM+AU ($198.40 \pm 11.78\%$) par rapport au groupe contrôle ($100 \pm 6.56\%$) à 24 heures de reperfusion. La même tendance est observée dans l'hippocampe avec le groupe SHAM+AU à ($137.38 \pm 7.88\%$) et le groupe SHAM à ($97.25 \pm 4.90\%$) (Figure 7).

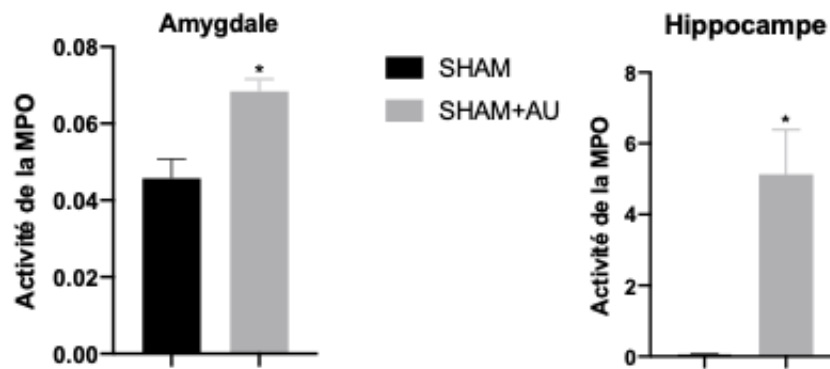


Figure 9. L'acide urique exogène augmente l'infiltration par les neutrophiles.

Dosage de l'activité de la MPO dans l'amygdale et l'hippocampe dans le groupe SHAM (n=4) et SHAM+AU (n=6) 24h après la chirurgie *(p<0.05).

À 24 heures de reperfusion nous avons comparé les groupes SHAM et SHAM+AU. L'activité de la MPO est significativement ($t(8)=-3.61$; $p<0.05$) plus élevée dans le groupe SHAM+AU (0.068 ± 0.003) en comparaison au groupe SHAM (0.046 ± 0.005) au niveau de l'amygdale. Pour l'hippocampe, le même phénomène est observé avec le groupe SHAM+AU (5.133 ± 1.252) significativement ($t(8)=-4.05$; $p<0.05$) plus élevée que le groupe SHAM (0.062 ± 0.007) (Figure 8).

De plus, au niveau de l'amygdale, une corrélation est établie entre l'expression de ICAM-1 (Figure 7) et l'activité de la MPO (Figure 8). Un test de Pearson $r=0.751$; $p\leq 0.05$ nous permet de déterminer que plus l'expression de ICAM-1 augmente plus l'activité de MPO augmente de manière proportionnelle. Au niveau de l'hippocampe, le test de Pearson ($r=0.919$; $p\leq 0.05$) permet d'observer la même corrélation significative qu'au niveau de l'amygdale.

3.4 Neuroinflammation

3.4.1 Activation de l'astroglie (GFAP) et de la microglie (Iba1)

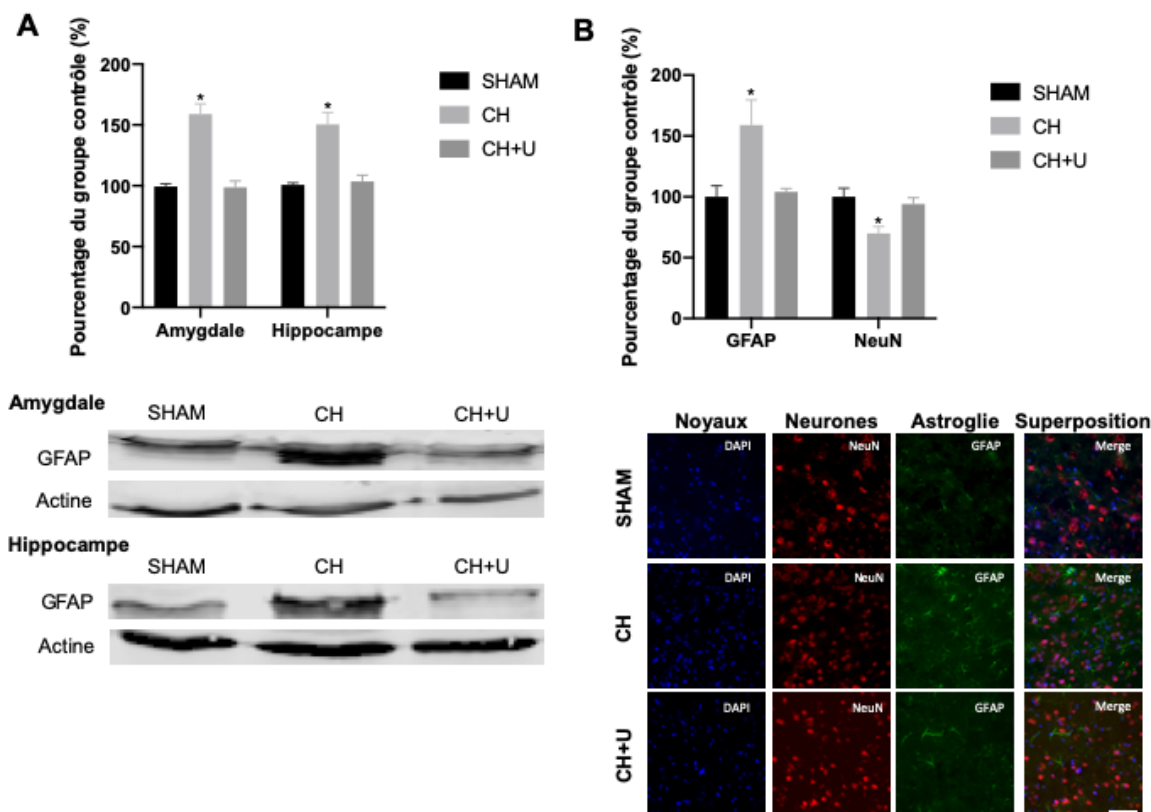


Figure 10. L'uricase prévient l'activation des astrocytes.

A. Dosage de GFAP par WB dans l'amygdale et l'hippocampe dans le groupe SHAM (n=10), CH (n=9) et CH+U (n=6) à 72h de reperfusion (p<0.05). *Games-Howell (p<0.05) comparaison avec SHAM et CH+U.

B. Surface occupée par les colorations NeuN (neurones) et GFAP (astroglies) exprimées en pourcentage du groupe contrôle et co-coloration par immunofluorescence de NeuN (neurones) en rouge, GFAP (astroglies) en vert et DAPI (noyaux) en bleu pour les groupes SHAM (n=3), CH (n=3) et CH+U (n=4); Échelle= 50 µm. *Bonferroni (p<0.05) comparaison avec SHAM et CH+U.

À 72h de reperfusion, il y a activation significative ($F(2,48)=21.37$; $p<0.05$) des astrocytes dans l'amygdale après le CH ($158.87 \pm 8.50\%$) en comparaison aux groupes SHAM ($99.37 \pm 2.19\%$) et CH+U ($98.80 \pm 5.14\%$). La même activation est observée dans l'hippocampe ($F(2,69)=18.03$; $p<0.05$) avec CH à ($150.48 \pm 9.74\%$), SHAM à ($100.77 \pm 1.58\%$) et CH+U à ($103.65 \pm 5.11\%$) (Figure 9).

La même tendance est observée pour l'immunomarquage de NeuN et GFAP où il y a activation de l'astroglie au détriment des neurones dans le groupe CH. La surface occupée par les

astrocytes exprimée en pourcentage du groupe contrôle est significativement plus élevée ($F(2,7)=7.50$; $p<0.05$) dans le groupe CH ($158.89 \pm 20.65\%$) en comparaison aux groupes SHAM ($100.00 \pm 15.86\%$) et CH+U ($104.03 \pm 2.78\%$). De plus, la surface occupée par les neurones exprimée en pourcentage du groupe contrôle est significativement diminuée ($F(2,7)=6.88$; $p<0.05$) dans le groupe CH ($69.93 \pm 5.59\%$) en comparaison aux groupes SHAM ($100 \pm 7.02\%$) et CH+U ($94.16 \pm 5.09\%$) (Figure 9).

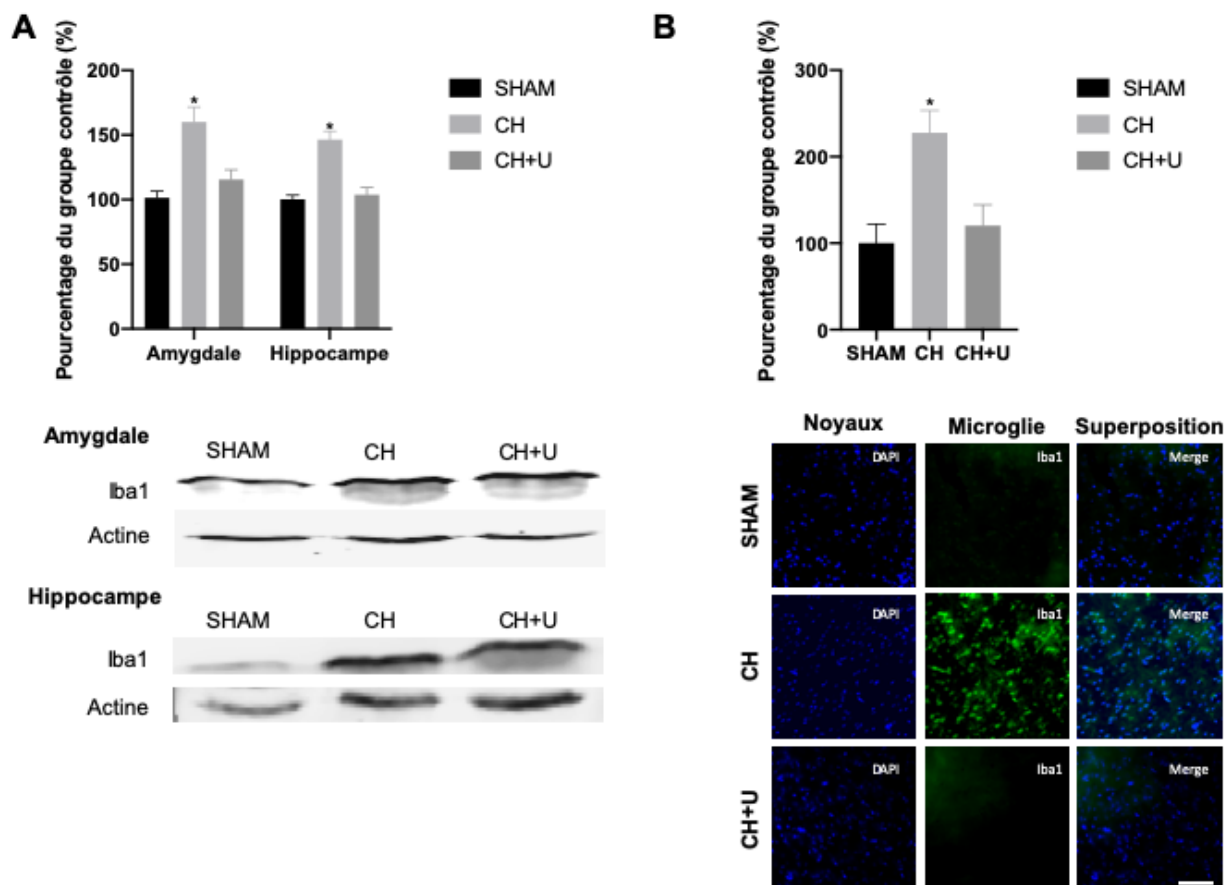


Figure 11. L'uricase prévient l'activation de la microglie.

A. Dosage de la concentration de Iba1 par WB dans l'amygdale et l'hippocampe pour les groupes SHAM (n=10), CH (n=9) et CH+U (n=6) 72h après la chirurgie ($p<0.05$). *Games-Howell ($p\leq 0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

B. Co-coloration par immunofluorescence de Iba1 (microglie) vert et DAPI (noyaux) bleu pour les groupes SHAM (n=3), CH (n=3) et CH+U (n=5); Échelle=50 μ m. *Bonferroni ($p<0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

À 72h de reperfusion, il y a activation significative ($F(2,49)=14.79$; $p<0.05$) de la microglie dans l'amygdale après le CH ($160.06 \pm 11.48\%$) en comparaison aux groupes SHAM ($101.46 \pm 5.12\%$) et CH+U ($115.62 \pm 7.44\%$). La même activation ($F(2,72)=25.45$; $p<0.05$) est observée dans

l'hippocampe avec CH à $(146.47 \pm 6.42)\%$, SHAM à $(100.25 \pm 3.23)\%$ et CH+U à $(103.74 \pm 5.70)\%$ (Figure 10).

La même tendance qu'avec les WB est observée pour l'immunomarquage de Iba1 où il y a plus grande activation de la microglie dans le groupe CH. En effet, un compte du nombre de cellules positives pour Iba1 et une expression en pourcentage du groupe contrôle, nous permet de détecter une augmentation significative ($F(2,8)=6.44$; $p<0.05$) dans le groupe CH ($227.69 \pm 44.54\%$) en comparaison aux groupes SHAM ($100.00 \pm 22.02\%$) et CH+U ($120.36 \pm 24.01\%$) (Figure 10).

3.4.2 Libération d'IL-1 β dans le cerveau après CH

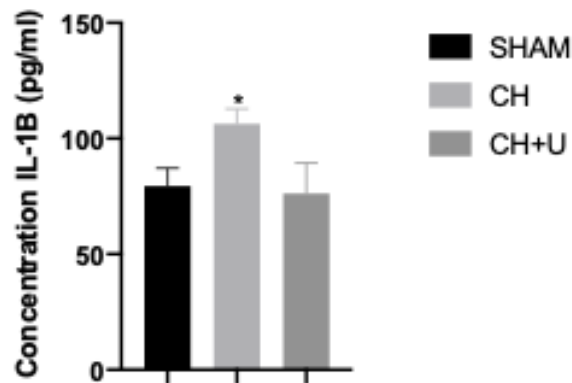


Figure 12. L'uricase prévient une augmentation de l'IL-1 β au niveau cérébral.

Dosage de la concentration d'IL-1 β par ELISA dans le cerveau à 24 heures de reperfusion pour les groupes SHAM (n= 10), CH (n= 7) et CH+U (n= 5); ($p<0.05$). *Bonferroni ($p<0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

La concentration d'IL-**1 β** dans le groupe CH (106.26 ± 7.73) pg/ml est significativement ($F(3,25)=3.01$; $p<0.05$) plus élevée que celle dans les groupes CH+U (76.14 ± 13.26)pg/ml et SHAM (79.49 ± 7.73)pg/ml (Figure 11).

3.5 Apoptose dans le cerveau

3.5.1 Activité de la caspase-3 et coloration TUNEL

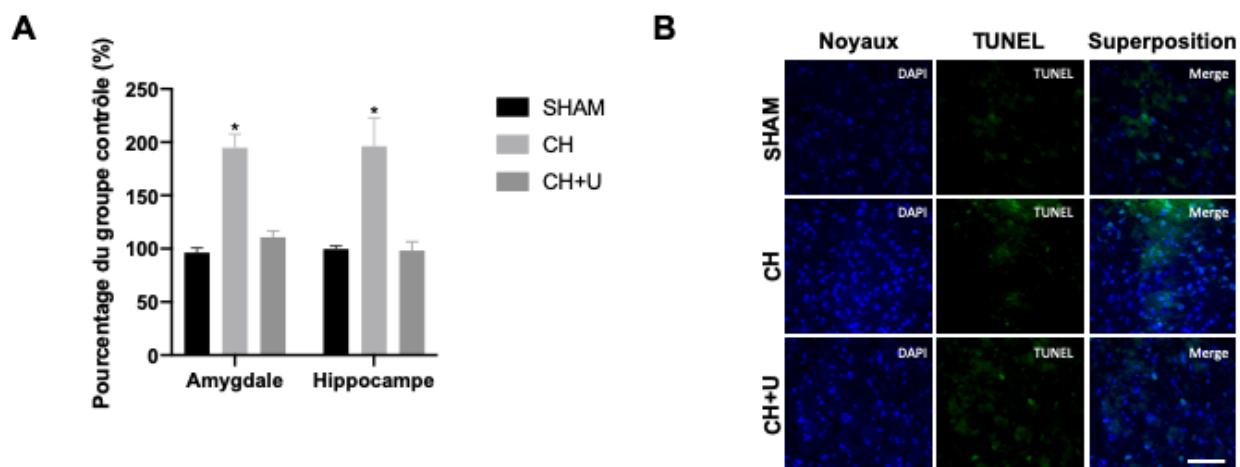


Figure 13. L'uricase prévient la mort cellulaire par apoptose.

A. Mesure de l'activité de la caspase-3 par essai enzymatique fluorimétrique dans l'amygdale et l'hippocampe pour les groupes SHAM (n= 8), CH (n= 8) et CH+U (n= 6); ($p < 0.05$). *Games-Howell ($p < 0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

B. Coloration des noyaux (DAPI; bleu) et TUNEL (vert) pour détection de cellules apoptotiques dans les groupes SHAM (n=2); CH (n=2) et CH+U (n=2). Échelle=50 μ m. Test du Khi-carré ($p < 0.05$).

L'activité de la caspase-3 a été mesurée après 72 heures de reperfusion au niveau de l'amygdale et de l'hippocampe. Les données présentées correspondent à l'activité de la caspase-3 exprimée en pourcentage du groupe SHAM. Dans l'amygdale, on distingue une augmentation significative ($F(2,37)=35.59; p < 0.05$) pour le groupe CH ($194.60 \pm 13.00\%$) en comparaison aux groupe SHAM ($96.37 \pm 4.28\%$) et CH+U ($110.65 \pm 6.02\%$). La même tendance significative est observée au niveau de l'hippocampe ($F(2,44)=16.84; p < 0.05$) où le groupe CH ($196.25 \pm 26.67\%$) est plus élevé que les groupe SHAM ($99.73 \pm 2.97\%$) et CH+U ($98.18 \pm 8.31\%$) (Figure 12).

Pour la coloration TUNEL, une différence significative entre les groupes (χ^2 (ddl 2) = 359.98, phi 0.176, ; $p < 0.05$) est détectée. Une partition selon Siegel et Castellan nous indique que le groupe CH 11.02 % de cellules TUNEL positives est significativement plus élevé que le groupe SHAM 1.99 % de cellules positives et le groupe CH+U 4.78 % de cellules positives (Figure 12).

3.5.2 Coloration au Fluorochrome

La co-coloration entre le Fluorochrome et la protéine NeuN nous permet de détecter la proportion de neurones en dégénérescence en comparaison aux neurones totaux.

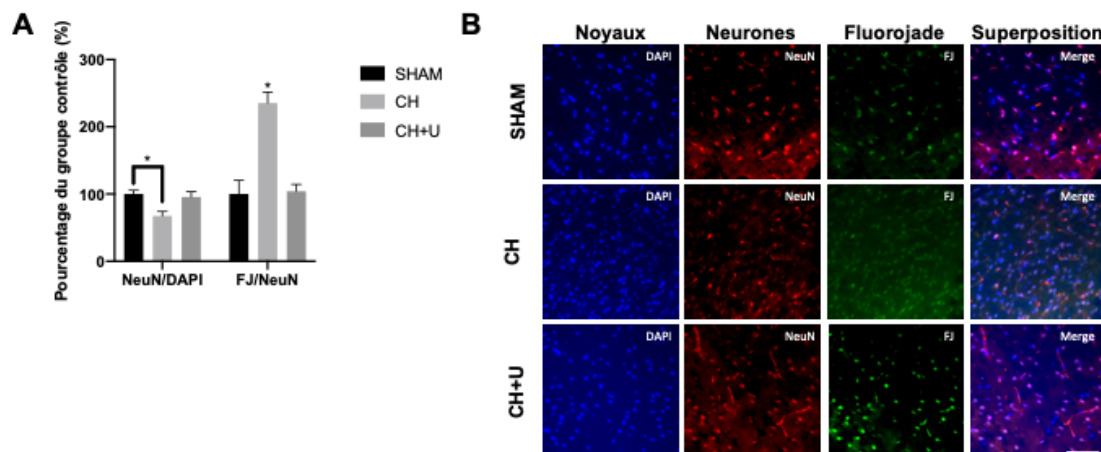


Figure 14. L'uricase prévient la dégénérescence neuronale.

Coloration au Fluorochrome de cryosections de 15 μm d'épaisseur pour les groupes SHAM (n= 3), CH (n= 3) et CH+U (n= 3); ($p < 0.05$). Bleu : DAPI (noyaux); Rouge : NeuN (neurones); Vert : Fluorochrome; Échelle=50 μm . Ratio NeuN/DAPI pour quantifier la présence de neurone et ratio de FJ/NeuN pour quantifier la proportion de dégénérescence des neurones. *Bonferroni ($p < 0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

Le compte des cellules positives pour NeuN nous permet de détecter une diminution significative ($F(2,8)=5.88$; $p \leq 0.05$) dans le groupe CH (67.39 ± 6.75 %) en comparaison au groupe SHAM (100.00 ± 5.62 %). Les données sont exprimées en pourcentage du groupe contrôle. Aucune autre différence n'est détectée entre les groupes.

Les comptes des cellules positives pour FJ en rapport aux cellules positives pour NeuN nous permettent de détecter une diminution significative ($F(2,8)=19.81$; $p \leq 0.05$) dans le groupe CH (235.33 ± 16.27 %) en comparaison au groupe SHAM (100.00 ± 20.32 %) et au groupe CH+U (104.13 ± 10.36 %) (Figure 13).

3.6 Tests de comportements

3.6.1 Test de labyrinthe en croix surélevé

Pour le test du labyrinthe en croix surélevée, nous avons considéré 2 facteurs pour les branches ouvertes et fermées : le nombre d'entrées et le temps passé dans chaque type de branche. Un nombre d'entrées augmentées ainsi qu'une augmentation du temps passé dans les branches fermées sont un signe de comportements anxieux (183).

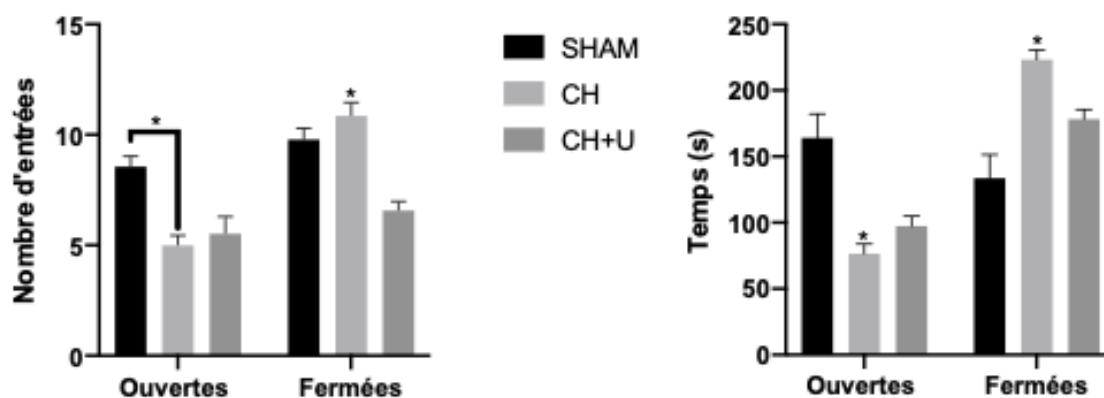


Figure 15. Résultats du test du labyrinthe en croix surélevée.

Résultats obtenus pour la mesure de 4 paramètres dans le test du labyrinthe en croix surélevé. S : secondes.

*Bonferroni ($p < 0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

Pour les branches ouvertes, nous avons une diminution significative du nombre d'entrées ($F(2,20) = 4.99$; $p \leq 0.05$) pour le groupe CH (4.99 ± 0.46) en comparaison au groupe SHAM (8.56 ± 0.47). Une diminution significative du temps passé (secondes) dans les branches ouvertes ($F(2,20) = 10.87$; $p \leq 0.05$) est aussi détectée pour le groupe CH (76.57 ± 7.21), comparé aux groupes SHAM (164.11 ± 18.02) et CH+U (121.57 ± 7.40) (Figure 14).

Pour les branches fermées, nous avons une augmentation significative d'entrées ($F(2,20) = 6.35$; $p \leq 0.05$) pour le groupe CH (10.86 ± 0.60) comparé au groupe SHAM (9.78 ± 0.52) et au groupe CH+U (8.14 ± 0.40). Une augmentation significative ($F(2,20) = 11.65$; $p \leq 0.05$) du temps passé (secondes) dans les branches ouvertes pour le groupe CH (223.14 ± 7.32), comparé aux groupes SHAM (133.56 ± 17.77) et CH+U (178.14 ± 7.32) (Figure 14).

3.6.2 Test de nage forcée

Pour le test de nage forcée, 4 paramètres ont été évalués : le temps d'immobilité, le temps d'échappement, le temps de nage et le temps de délai à la première immobilité.

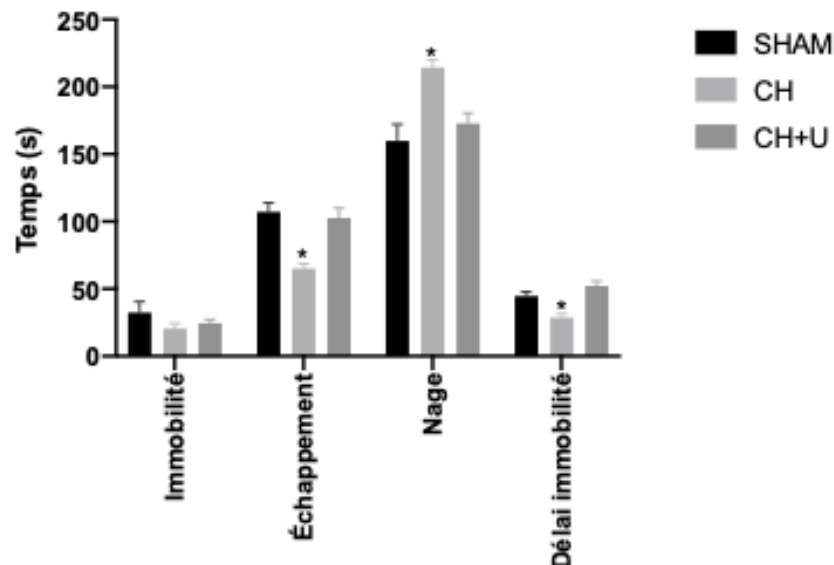


Figure 16. Résultats du test de nage forcée.

Évaluation de 4 paramètres (immobilité, échappement, nage et délai immobilité) sur vidéo d'une durée totale de 5 minutes. (p<0.05). S : secondes. *Bonferroni (p<0.05) comparaison avec SHAM et CH+U.

Pour le temps total d'immobilité aucune différence significative est observée entre les groupes (p>0.05).

Pour le temps (secondes) d'échappement une diminution significative ($F(2,20)=13.46$; $p\leq 0.05$) dans le groupe CH (65.14 ± 3.43) est détectée, comparé aux groupes SHAM (107.22 ± 6.54) et CH+U (102.57 ± 7.39) (Figure 15).

Le temps (secondes) de nage est significativement augmenté ($F(2,20)=8.23$; $p\leq 0.05$) dans le groupe CH (214.29 ± 5.81), comparé aux groupes SHAM (159.89 ± 12.37) et CH+U (172.86 ± 7.58).

Le délai (secondes) jusqu'à la première immobilité est significativement diminué ($F(2,20)=13.81$; $p\leq 0.05$) dans le groupe CH (28.71 ± 2.85), comparé aux groupes SHAM (44.78 ± 3.04) et CH+U (52.29 ± 3.35) (Figure 15).

3.6.3 Test d'interaction sociale

Pour le test d'interaction sociale, nous avons mesuré 3 facteurs : le temps d'interaction en secondes, le nombre de redressements et le nombre de toilettages.

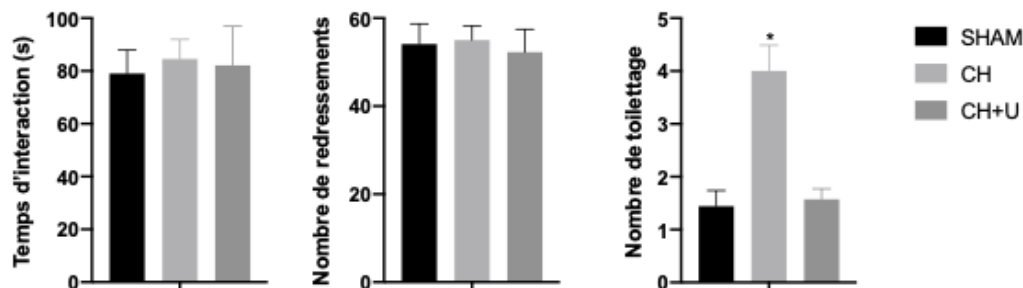


Figure 17. Résultats du test d'interaction sociale.

Évaluation de 3 paramètres (temps d'interaction, nombre de redressements et nombre de toilettages) dans le test d'interaction sociale pour le groupe SHAM (n=9), CH (n=7) et CH+U (n=7). *Bonferroni ($p < 0.05$) comparaison avec SHAM et CH+U.

Pour le temps d'interaction sociale et le nombre de redressements, nous n'observons aucune différence significative entre les groupes $p > 0.05$. Pour le nombre de toilettage une augmentation significative ($F(2,20)=17.00$; $p \leq 0.05$) a été mesurée dans le groupe CH (4.00 ± 0.49), comparé aux groupes SHAM (1.44 ± 0.29) et CH+U (1.57 ± 0.20) (Figure 16).

3.7 Analyse de la corticostérone plasmatique

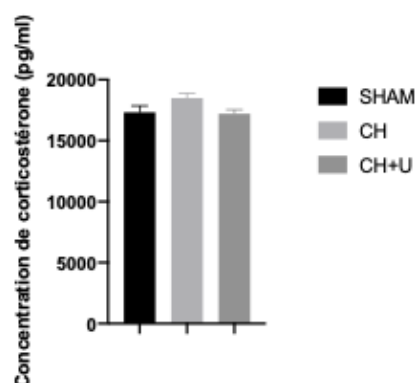


Figure 18. Concentration de corticostérone plasmatique au sacrifice.

Dosage de la concentration plasmatique de corticostérone 3 semaines après la chirurgie.

Pour le dosage de la corticostérone plasmatique nous n'observons aucune différence significative entre les groupes, au moment du sacrifice $p > 0.05$ (Figure 17)

4 Discussion

Nos résultats illustrent l'implication de l'AU augmenté en circulation après le CH (7) et son impact sur le SNC, plus précisément sur le système limbique. En effet, son rôle sur la BHE, la neuroinflammation et l'apoptose dans le contexte d'ischémie-reperfusion sont démontrés dans notre modèle murin de CH réanimé. De plus, nos observations structurales et moléculaires se traduisent chez les animaux par une altération des comportements avec une augmentation particulière de l'anxiété et la dépression, prévenue par une intervention sur l'AU circulant à l'aide d'une uricase donnée au moment de la reperfusion.

4.1 Données hémodynamiques

Tel que rapporté par des publications préalables utilisant notre modèle (7), les valeurs hémodynamiques (pression et bpm) sont uniformes dans tous les groupes. De plus, durant la période d'ischémie (choc hémorragique), il n'y a pas de différence marquée dans la pression sanguine moyenne et dans la fréquence cardiaque pour les groupes CH et CH+U. Le pourcentage du volume sanguin prélevé utilisé pour la reperfusion est aussi similaire pour les groupes CH et CH+U, ainsi que la quantité de cristalloïdes administrés. La seule intervention (uricase), qui vient spécifiquement diminuer l'AU circulant (7), n'influence pas les données hémodynamiques dans le groupe CH+U.

4.2 Validité du traitement avec l'uricase

Le traitement avec l'uricase constitue une avenue intéressante, car il peut être facilement transposé en clinique. En effet, l'uricase peut être donnée aux patients à leur arrivée à l'hôpital conjointement aux fluides de reperfusion sans nécessiter un prétraitement. Cela justifie aussi notre choix d'utiliser l'uricase plutôt que l'allopurinol qui empêcherait la production d'AU au lieu de le métaboliser (79).

De plus, nous avons préalablement démontré, au niveau d'autres organes (poumons, foie et reins) que l'utilisation d'une uricase permet de prévenir les lésions après le CH (7,184). Ces évidences nous permettent de confirmer que les changements observés, impliquent spécifiquement l'AU, supportant son rôle dans l'atteinte du SNC après le CH. De plus, notre

traitement (uricase) vient proposer une nouvelle vision sur les lésions de reperfusion en ne mettant pas le blâme sur la reperfusion en général, mais plutôt en ciblant un acteur spécifique, l'acide urique. De plus, nous ne réduisons pas le volume utilisé pour la reperfusion tel que par l'utilisation de vasopresseurs (33), mais nous venons plutôt modifié spécifiquement la concentration d'un médiateur circulant.

Notre modèle et l'utilisation d'une stratégie venant « détruire » l'acide urique est à mettre en contraste avec la littérature sur l'AVC, qui suggérait un rôle bénéfique de l'AU. En effet, en contexte d'IR cérébrale locale l'AU peut avoir un rôle protecteur contre les déficits cognitifs (83). De plus, une étude *in vitro* a démontré l'implication de l'AU dans la neuroprotection et la survie neuronale (185). Finalement, l'AU est aussi impliquée dans une diminution de la taille de l'infarctus causé par l'AVC (185). Dans notre modèle, d'IR systémique les données obtenues viennent contredire cette littérature en démontrant un effet néfaste de l'AU au niveau cérébral. Afin de confirmer le fonctionnement adéquat de l'uricase dans notre modèle, il aurait pu être pertinent de doser l'allantoïne. Par contre, l'uricase utilisée (Fasturtec Rasburicase) a déjà fait ses preuves en clinique (8). Nous nous sommes donc contentés de démontrer son efficacité à réduire l'AU circulant dans un modèle de CH.

4.3 **Atteinte structurale cérébrale après le choc hémorragique**

L'atteinte cérébrale causée par le choc hémorragique est un phénomène bien décrit dans les modèles précliniques (19,148,174,186), mais peu investigué pour ses conséquences cliniques à long terme. De plus, peu d'études se sont intéressées à des régions spécifiques du SNC, seulement quelques études se sont intéressées à l'hippocampe (148) à cause de sa sensibilité particulière à l'ischémie (115,187). Ce travail permet de mettre en avant différentes atteintes structurales du SNC, au niveau du système limbique, et leur impact sur la qualité de vie des individus touchés en liant ces atteintes aux altérations comportementales. Notre intérêt particulier pour le SL, plus particulièrement pour l'amygdale et l'hippocampe, vient de la sensibilité accrue à l'ischémie de ces deux régions clés du cerveau (115,188,189).

4.3.1 Atteinte de la barrière hématoencéphalique

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'atteinte de la perméabilité de la BHE à cause de son implication dans diverses maladies neuroinflammatoires telles que la maladie d'Alzheimer's (190), le Parkinson's (191) et les syndromes métaboliques tels que le diabète (192). De plus, il s'agit de la première structure atteinte du parenchyme cérébral à cause de son contact étroit avec la circulation sanguine systémique. En effet, l'AU est un médiateur inflammatoire provenant de la lésion ischémique d'organes autre que le cerveau tel le foie, les intestins et l'endothélium (67), il devra donc passer la BHE pour avoir des effets sur le système nerveux central.

Le rôle de l'ischémie-reperfusion dans l'altération de la perméabilité de la BHE est un bien connu autant dans l'AVC (IR cérébrale locale) (171,193,194) que dans des modèles de CH (IR systémique) (174,195). L'ischémie altère l'expression et la fonctionnalité des protéines de jonctions (171) ainsi que le transport transcellulaire (196) par les cellules endothéliales composant la BHE favorisant ainsi le passage de substances potentiellement nocives dans le parenchyme cérébral. Une diminution des protéines de jonctions impliquées (ZO-1, Cldn-5 et occludine) est rapportée autant dans un modèle d'AVC et que de CH (42,43). Dans notre modèle, nous avons observé les mêmes phénomènes d'altération de la BHE que d'autres auteurs (174) à l'aide de la NaF. Nous nous intéressons spécifiquement à l'amygdale et l'hippocampe à cause de leur sensibilité à l'ischémie (187,197) et leur rôle central dans la régulation des comportements (198).

La NaF est une molécule de petite taille et soluble dans le sang, donc son passage au niveau cérébral après le CH est signe d'une altération minimale de la BHE (172). Une altération plus importante aurait pu être testée afin de détecter le passage de molécules plus grandes, en utilisant le BE qui peut former des complexes avec l'albumine lui conférant un poids moléculaire plus élevé (172). Sachant que le NaF a un poids moléculaire de 376.3 Da (172), le poids moléculaire de l'AU (168 Da), plus faible, lui permet également de passer la BHE (67,181). Nous avons également confirmé l'augmentation de la concentration d'AU au niveau de l'amygdale et de l'hippocampe pour le groupe CH. De plus, l'atteinte de la barrière endothéliale et l'efficacité d'un traitement à l'aide d'une uricase pour réduire cette altération a été

confirmée au niveau pulmonaire pour les cas de syndrome de détresse respiratoire (199). L'augmentation d'AU au niveau cérébral est due presque exclusivement au passage d'AU circulant dans le parenchyme, car les cellules cérébrales produisent rarement de l'AU, à cause de l'absence de l'enzyme xanthine oxydase au niveau du SNC (200). La littérature mentionne également une expression accrue de la xanthine oxydase par les ECs au niveau cérébral favorisée par une altération de la perméabilité de la BHE dans les cas d'ischémie (201). L'augmentation de l'AU dans le parenchyme cérébral a également été rapportée après une ischémie locale (202).

En plus de l'effet de l'ischémie seule, l'implication de l'AU dans la dysfonction endothéliale a été démontrée à plusieurs reprises *in vitro* et *in vivo* (169,180,203). Par contre, ces modèles ciblent généralement les vaisseaux sanguins en général sans s'intéresser précisément à la BHE. Des modèles d'AVC ont suggéré un effet bénéfique de l'AU (exogène) sur la BHE, diminuant ainsi la taille des lésions cérébrales (83,87,204). Dans notre modèle, le rôle de l'AU semble être en faveur d'une altération de la perméabilité de la BHE, car sa destruction par l'uricase permet de prévenir une augmentation de la perméabilité après le CH. Nos résultats ne se rapportent donc pas à la littérature sur l'AVC, mais il est important de noter que l'AVC n'a pas les mêmes effets systémiques que le CH ce qui pourrait expliquer la divergence dans les résultats obtenus. De plus, l'AU circulant augmenté peut entraîner la libération de protéine C-réactive entraînant une réponse inflammatoire systémique favorisant la transition d'agent antioxydant à agent prooxydant (203) augmentant ainsi les risques de lésions endothéliales.

Un autre impact connu de l'AU sur l'endothélium est l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion ICAM-1, démontrée *in vitro* (170), qui semble un mécanisme *in vivo* probable vu sa circulation intravasculaire. Dans notre modèle d'IR, nous avons donc confirmé l'implication de l'AU circulant dans l'augmentation de l'expression de ICAM-1 au niveau cérébral ; la destruction de l'AU circulant prévient ce phénomène. L'augmentation de l'expression de ICAM-1 au niveau de l'endothélium de la BHE est problématique, car elle peut mener au bris de l'exclusivité immunitaire du SNC en favorisant le recrutement de cellules inflammatoires systémiques (149,164). Une voie de signalisation possible pour expliquer cette augmentation d'ICAM-1 est celle du TLR4 activant l'inflammasome NLRP3. L'AU peut se lier au

TLR4 et mener à son activation pour libérer d'autres alarmines (101,169). Par le TLR4, l'activation de l'inflammasome NLRP3 peut aussi entraîner une augmentation de l'expression de la protéine ICAM-1 par les cellules endothéliales (72).

Donc, une combinaison de l'IR et de l'augmentation de l'AU circulant altère grandement l'étanchéité de la BHE en portant atteinte à la fois à l'intégrité de l'endothélium et à la capacité de la BHE à maintenir l'exclusivité immunitaire.

4.3.2 Atteinte neuroinflammatoire du parenchyme cérébral

Étant-donné l'atteinte de la BHE par l'AU circulant, ceci peut avoir un impact sur la neuroinflammation au travers de deux phénomènes : en favorisant le recrutement de cellules inflammatoires systémiques et en activant les cellules inflammatoires résidentes.

Nous avons démontré l'implication de l'AU dans l'augmentation de l'expression de ICAM-1 qui permet l'adhésion et la migration transendothéliale des neutrophiles via la protéine spécifique LFA-1 (50,166). Pour mesurer la concentration de neutrophiles dans l'amygdale et l'hippocampe nous avons mesurer l'activité de la MPO qui est corrélée avec le nombre de neutrophiles (182). Nous nous sommes intéressés aux neutrophiles, car ils sont le type cellulaire systémique le plus commun au niveau cérébral (134,137) et sont neurotoxiques (137). Nos résultats démontrent que cibler spécifiquement l'AU circulant permet de diminuer l'expression cérébrale d'ICAM-1 et du fait même l'infiltration neutrophilaire. Une activité augmentée de la MPO après le CH avait été rapportée dans une étude par Eser et al. (20). De plus, nous avons préalablement démontré rôle de l'AU dans l'infiltration par les neutrophiles au niveau des poumons et des reins dans notre modèle (7).

Donc, l'AU favorise l'expression de ICAM-1 qui à son tour facilite l'infiltration du parenchyme cérébral par les neutrophiles en réponse à la neuroinflammation.

Nous nous sommes ensuite intéressés à deux types de cellules inflammatoires résidentes au SNC, soit les astrocytes et la microglie.

Pour les astrocytes, l'expression de la protéine spécifiques GFAP a été mesurée dans le tissu cérébral par WB et par IF (120,124). Nous avons constaté une augmentation significative de l'expression de GFAP suite au CH, correspondant à une activation des astrocytes au niveau du

tissu cérébral. Cette même activation et hyperplasie des astrocytes après CH avaient préalablement été détectées par IF dans un modèle de CH chez le porc et chez le rat (145,205). Les astrocytes sont reconnus pour leur capacité de réparation dans le SNC formant une cicatrice astrogliale. Ce type de cicatrisation étant fréquemment observé près du site infarci dans l'AVC, il est plausible de l'observer dans le cerveau après le CH (133), plus particulièrement au niveau de l'hippocampe qui est une région reconnue pour sa sensibilité à l'IR (187). Dans notre modèle, une diminution significative des neurones après CH (coloration spécifique par NeuN), joint à une augmentation de la surface occupée par les astrocytes, vient appuyer le fait que les astrocytes sont activés par le CH. L'intervention diminuant la circulation d'AU (uricase) (7) et sa pénétration dans le parenchyme cérébral permet de prévenir l'activation astrogliale. Les astrocytes peuvent aussi être activés en réponse à l'altération de la BHE, car ils tentent de compenser les lésions endothéliales et de maintenir l'intégrité de la barrière (158,197–200).

L'activation des astrocytes peut être favorisée par l'activation de la microglie. Pour l'étude des cellules microgliales activées, nous avons ciblé la protéine Iba1 (132,209). La microglie est un type cellulaire ayant des fonctions similaires aux macrophages à cause de leur origine embryologique commune et qui peut libérer des cytokines pro-inflammatoires (114,202-204). Dans notre modèle, nous observons une augmentation significative de l'expression de Iba1, signifiant une activation et une prolifération microgliale (209). L'intervention avec une uricase prévient l'activation de la microglie. L'activation de la microglie peut passer par divers mécanismes tels la reconnaissance de PAMPs ou de DAMPs (118). Dans notre cas, le passage de l'AU vers le cerveau est fort probablement responsable (4,181). Nous pensons également que la stimulation de l'inflammasome de la microglie (71,211) produisant de l'IL-1 β (212), dont nous avons démontré l'augmentation dans le parenchyme cérébral, peut contribuer à cette activation.

La libération d'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire, par la microglie activée augmente dans le groupe CH et est entre autres impliqué dans l'activation des astrocytes pour la formation de la cicatrice astrogliale (213). L'IL-1 β peut aussi favoriser le recrutement de neutrophiles lors d'une réponse inflammatoire massive telle qu'après une IR (136,137). Une autre étude a

également démontré le rôle central de l'IL-1 β dans l'initiation d'une réponse neuroinflammatoire par l'injection de cette cytokine directement dans le cerveau (214). La microglie est donc participante centrale dans la réponse neuroinflammatoire, car elle est directement activée par l'AU et produit l'IL-1 β qui joue un rôle dans l'activation des astrocytes et dans le recrutement des cellules inflammatoires systémiques.

Nous pouvons donc conclure que l'AU circulant active l'expression de ICAM-1 au niveau de l'endothélium, tout en pénétrant dans le parenchyme cérébral suite au CH, activant ainsi l'inflammasome (NLRP3) de la microglie favorisant la libération d'IL-1 β . Cette cytokine et le contexte inflammatoire favorisent le recrutement de neutrophiles et la formation de la cicatrice astrogliale.

4.3.3 Effet de l'acide urique sur l'apoptose dans le cerveau

L'IR ainsi que la réponse inflammatoire s'en suivant peuvent causer la mort cellulaire des neurones au niveau du système limbique ce qui est problématique, car le système limbique comprend plusieurs circuits neuronaux régulant les comportements (215). Le rôle du CH dans l'initiation de la réponse apoptotique au niveau cérébral est bien détaillé dans la littérature (20,146,148,216). Cependant, des conclusions contradictoires décrivent l'effet de l'AU sur la mort cellulaire dans le cerveau après l'IR. Certaines études dans des modèles d'AVC ont démontré une diminution de la mort cellulaire suite à un traitement avec de l'AU (83,87,217), alors que d'autres montrent un effet néfaste par exacerbation de la réponse inflammatoire et du stress oxydatif (202).

Nos données démontrent une augmentation significative de l'apoptose, par une augmentation de l'activité de la caspase-3 et de cellules TUNEL-positives dans le parenchyme cérébral suite au CH, prévenue par l'uricase. De plus, l'apoptose semble touché majoritairement les neurones, tel que démontré par les résultats d'immunofluorescence. En effet, la quantité de neurones positifs pour le FJ, permettant de détecter les neurones en dégénérescence (218), est augmentée après le CH. Une explication possible de l'action de l'AU, dans l'initiation de l'apoptose, serait via la libération d'IL-1 β par la microglie (211). En effet, l'IL-1 β est reconnu pour son rôle dans l'initiation de lésions cérébrales secondaires après une IR (219). Le rôle pro-

apoptotique de l'IL-1 β est secondaire à l'activation de la C1 une protéine de la cascade de signalisation de l'inflammasome NLRP3 (220). De plus, conjointement à l'activation de l'inflammasome, la C8 peut réguler le clivage de la pro-IL-1 β et activer l'apoptose via la caspase-3 (97). Nous avons démontré précédemment l'action de l'AU sur l'activité de la caspase-8 et dans l'initiation de l'apoptose au niveau d'autres organes tel que les poumons et les reins (7).

L'AU peut aussi être impliqué en jouant sur la voie intrinsèque de l'apoptose, c'est-à-dire en causant des dommages mitochondriaux (139). En effet, une étude effectuée sur des cellules rénales a démontré un rôle de l'AU dans la production de ROS menant ainsi à l'apoptose via la voie intrinsèque (221). De plus, dans un modèle d'IR cérébrale locale, il a été démontré que l'AU favorise le stress oxydatif et l'apoptose (222).

Comme dans d'autres organes, la circulation d'AU peut participer à l'induction de l'apoptose, nous avons donc décidé de pousser plus loin en étudiant l'effet de l'AU au niveau du cerveau afin de voir les conséquences de la mort neuronale dans le système limbique sur l'altération des comportements.

4.4 Développement de comportements anxieux après le choc hémorragique

À cause de la réponse inflammatoire et apoptotique au niveau du SL causée par la circulation d'AU, la suite de ce projet est de regarder les conséquences comportementales à long terme. Peu d'études se sont intéressées à l'impact d'une atteinte cognitive après le CH sur la qualité de vie des patients malgré des lésions cérébrales importantes. Quelques études cliniques ont décrit une augmentation de la fatigue et de l'anxiété chez les patients avec polytrauma (45,102), mais les causes sous-jacentes ont rarement été étudiées. L'impact de l'atteinte neuroinflammatoire et apoptotique au niveau du système limbique (amygdale et hippocampe), dans notre modèle, se traduit par le développement de comportements anxieux, dont les symptômes s'apparentent aux observations cliniques. En effet, les structures cérébrales (amygdale et hippocampe) ciblées par notre étude sont reconnues pour leur implication dans le développement de l'anxiété. De plus, l'augmentation de la concentration d'IL-1 β au niveau cérébral a été corrélée avec une augmentation de l'anxiété (223).

L'amygdale est une région de la matière grise comportant des connections avec plusieurs autres régions. Des lésions au niveau de l'amygdale peuvent donc avoir des effets variés tel le développement de comportements dépressifs et anxieux ; les animaux deviennent souvent plus craintifs et agressifs (224). En effet, plusieurs circuits neuronaux importants passent au niveau de l'amygdale. L'amygdale contient entre autres ce qu'on appelle le circuit de l'anxiété. En effet, la réponse à un stimuli aversif prends fréquemment son origine dans l'amygdale. Pour réguler cette réponse, l'amygdale regroupe plusieurs interneurons inhibiteurs relâchant du GABA (225). Nos données démontrent une inflammation et une mort cellulaire importante qui peuvent interférer avec les circuits neuronaux et mener à une hyperexcitabilité de l'amygdale. Une approche pour confirmer cette hypothèse serait d'utiliser de la microdialyse cérébrale afin de doser la quantité de GABA au niveau cérébral pour détecter sa diminution causée par des lésions neuronales (226).

L'hippocampe est surtout connu pour son rôle dans la mémoire, sa lésion pourrait donc avoir un effet divergent de celui sur l'amygdale (227). Dans nos études pilotes (n=4/groupe), nous avons effectué le test de reconnaissance d'un nouvel objet (228) et d'évitement passif (229) qui permettent une détection des problèmes de mémoire, mais ne notions pas de différence entre les groupes. Le CH seul ne vient donc pas à lui seul influencer la mémoire des individus ayant été touchés par un polytrauma (217). Pour le test de reconnaissance d'un nouvel objet, l'absence de différence entre les groupes peut être plausible, car il a été préalablement démontré dans la littérature que les rats avec lésions permanente de l'hippocampe ne présentent pas de différence avec des rats SHAM pour ce test (228). Par contre, l'hippocampe est aussi impliqué dans le développement de l'anxiété. Il a été démontré qu'une structure anormale de l'hippocampe peut être corrélée avec l'anxiété chronique chez l'humain (230). Une lésion de l'hippocampe dans un modèle primate induit également une augmentation des comportements anxieux et une activation de l'HPA (231,232). Dans notre modèle, nous constatons de l'inflammation et de l'apoptose au niveau de l'hippocampe. Ceci est exprimé par un comportement anxieux exacerbé.

4.4.1 Atteinte comportementale : interprétation des tests utilisés

Les trois tests que nous avons utilisés sont reconnus pour leur efficacité à détecter l'anxiété et la dépression chez les rongeurs : le test du labyrinthe en croix surélevée (183,233,234), le test de nage forcée (235–237) et le test d'interaction sociale (238,239).

Le test du labyrinthe en croix surélevé est considéré comme valide pour mesurer l'anxiété chez le rat (183,233,234). Plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats obtenus, dont le labyrinthe en soi avec plusieurs variables telles, la hauteur, la présence de barrières le long des branches ouvertes, etc (233). L'utilisation d'un labyrinthe standard de marque Panlab permet de minimiser la variabilité due à l'équipement. Peu d'études se sont intéressées aux conséquences comportementales du CH. Par contre, le test du labyrinthe en croix surélevé a été utilisé à quelques reprises dans l'AVC (240,241). Une étude chez la souris démontre une augmentation du temps passé dans les branches fermées pour le groupe AVC, démontrant une augmentation des comportements anxieux (240). Chez le rat, l'IR cérébrale locale induit aussi une diminution significative du temps passé et du nombre d'entrées dans les branches ouvertes pour le groupe IR (242). Un autre article reporte une absence de différence dans le pourcentage de temps passé dans les branches ouvertes pour le groupe AVC en comparaison au groupe SHAM (241). Dans notre modèle de CH, nous avons observé une diminution significative du nombre d'entrées et du temps passé dans les branches ouvertes et une augmentation significative du nombre d'entrées et du temps passé dans les branches fermées (Figure 14). Toutes ces observations concordent avec le développement de comportements anxieux dans le groupe CH (234) et suivent ce qui a été observé dans les modèles murin d'IR cérébrale.

Le test de nage forcée est surtout utilisé pour la détection de la dépression, fréquemment associée à l'anxiété chronique chez l'humain (237,243). Dans l'AVC, le test de nage forcée permet de détecter une augmentation des comportements anxieux avec une immobilité augmentée (240,244). Dans notre modèle de CH, nous n'avons pas de différence pour le temps d'immobilité entre les groupes. Par contre, nous avons des différences pour le temps d'échappement et la latence à la première immobilité qui sont plus faibles suite au CH. Une diminution du temps d'échappement peut être signe d'une diminution de la

neurotransmission par la norépinéphrine (NE) (245). Une diminution de la NE est aussi reliée à une diminution du délai à la première immobilité (246). La libération de NE passe par des signaux au niveau de l'amygdale donc les lésions observées pourrait expliquer nos observations (247). Nous avons aussi une augmentation du temps de nage pour le groupe CH, qui est dû à la diminution du temps d'échappement ; lieu de tenter de s'échapper les rats CH nagent, ce qui permet de démontrer l'absence de différence locomotrice entre nos animaux. Les résultats obtenus avec le test de nage forcée pointent plus vers une diminution de la libération de NE et donc une augmentation des comportements dépressifs (248). Par contre, l'anxiété et la dépression sont des problèmes fréquemment liés (243). De plus, la signalisation par la NE passe en grande partie par l'amygdale (249) donc l'atteinte inflammatoire et apoptotique de cette région pourrait expliquer les comportements dépressifs secondaires. Il serait donc intéressant de doser la NE au niveau de l'amygdale pour confirmer le lien entre les atteintes structurelles et les résultats du test de nage forcée obtenus.

Le test d'interaction sociale est aussi fréquemment utilisé pour mesurer la dépression et dans certains cas l'anxiété (238,239). En effet, la dépression est souvent mesurée en calculant le temps d'interaction diminué (189,250), mais dans notre modèle nous n'observons aucune différence entre les groupes pour ce paramètre. Cependant, nous avons noté une différence significative dans le nombre de toilettages, signe d'inconfort (comportements anxieux), chez les animaux (238,239).

Pris dans leur globalité, nos résultats obtenus en tests de comportements démontrent une augmentation de l'anxiété et possiblement de la dépression des animaux qui corrèlent avec les atteintes parenchymateuses qui sont prévenues par le traitement d'uricase. Les atteintes comportementales suivent donc les résultats obtenus pour l'inflammation et l'apoptose au niveau du système limbique. L'AU peut aussi se lier au TLR4 dont l'expression augmentée est reliée au développement de comportements anxieux et dépressifs chez la souris (251). Il est important de noter que pour le modèle murin les tests utilisés pour mesure l'anxiété et la dépression sont fréquemment communs, il est donc difficile de distinguer ces deux atteintes comportementales observées de manière conjointe chez l'humain.

4.4.2 Circulation de corticostérone

Étant-donné que la corticostérone est la principale hormone impliquée dans le stress et l'anxiété (107), nous avons dosée son niveau plasmatique. Malgré une tendance d'augmentation pour le groupe CH, nous n'observons aucune différence entre les groupes. Cette absence de distinctions pour la corticostérone malgré une augmentation de l'anxiété pourrait être influencée par divers facteurs. Une première explication est le transport des hormones stéroïdiennes par des compartiments sur les globules rouges qui sous-estime son niveau réel. Lors de la collecte du plasma, la centrifugation élimine les globules rouges et donc une partie de la corticostérone plasmatique pourrait être perdue de cette manière (252). De plus, le délai entre la chirurgie (élément induisant le stress) et la collecte du plasma pour mesure de la corticostérone est possiblement trop long avec 21 jours. En effet, une étude par *Vogel et al.* montre que l'augmentation la plus significative de corticostérone est 14 jours après le stress (253). Un autre facteur pouvant augmenter la corticostérone chez les animaux est la réalisation de test comportementaux, donc cette augmentation est uniforme entre les groupes. Pour optimiser cette mesure il aurait donc été préférable d'effectuer un prélèvement deux semaines après la chirurgie, avant l'administration de tests comportementaux.

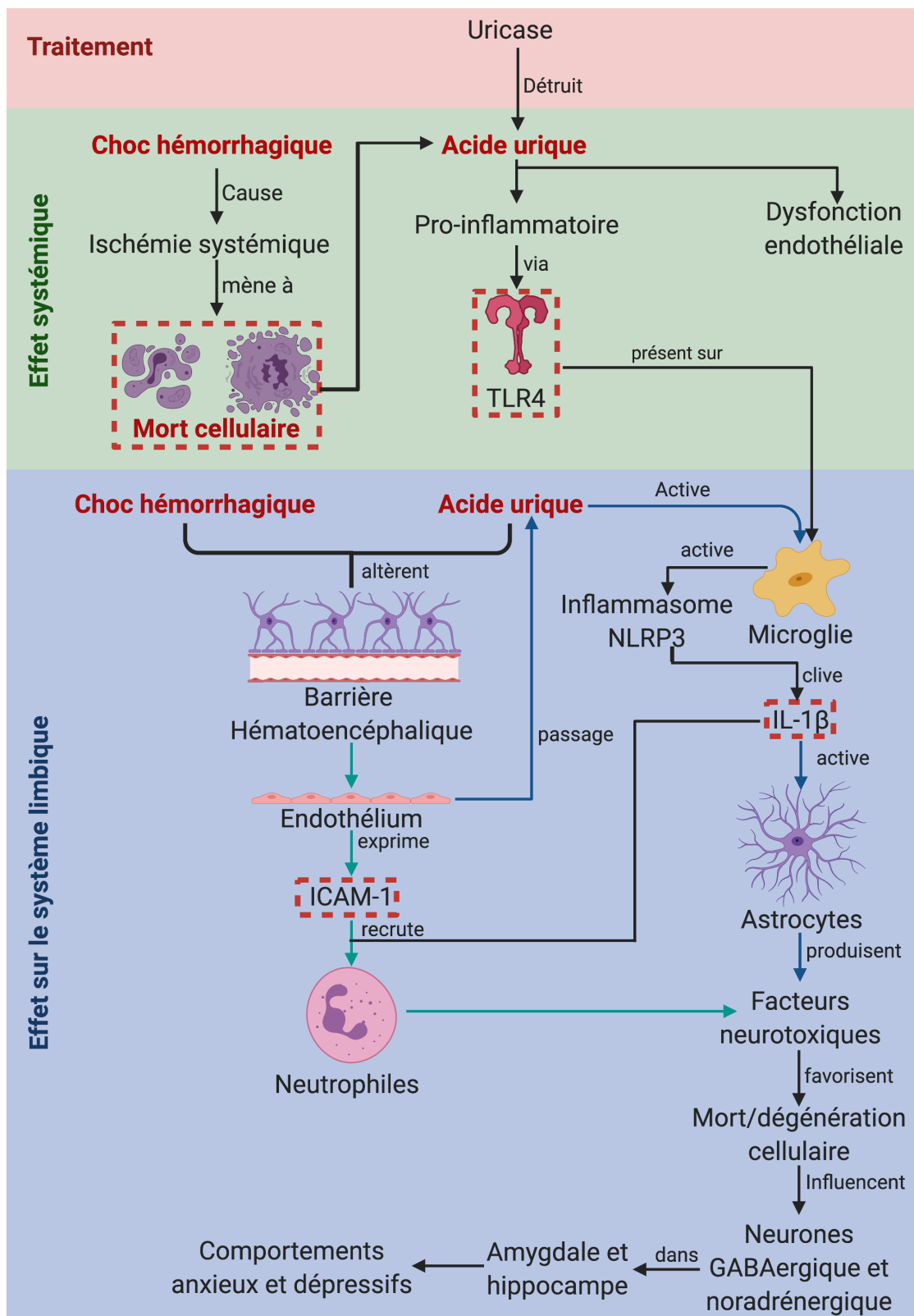


Figure 19. Résumé du mode d'action de l'acide urique dans le développement de lésions cérébrale secondaires après le choc hémorragique.

4.5 **Conclusions et perspectives d'expériences futures**

Pour conclure, nos résultats confirment notre hypothèse que l'AU joue un rôle important dans l'augmentation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique et de la neuroinflammation au niveau du système limbique. De plus, l'atteinte du système limbique se traduit par une altération des comportements avec une augmentation de l'anxiété et de la dépression chez les animaux après le CH. L'efficacité de notre intervention pour empêcher l'augmentation de l'AU post-CH est démontrée tant au niveau structurel que fonctionnel chez notre modèle.

La suite de ce projet serait de tester l'efficacité du traitement dans un modèle animal plus grand ayant plus de similitudes physiologiques avec l'humain tel que le porc. L'AU circulant chez les patients atteints de CH est actuellement dosé afin de déterminer si nos observations pourraient être transposées dans un contexte clinique. De plus, nos données pré-cliniques démontrent une implication importante de l'AU dans des lésions cérébrales pourraient mener à des études s'intéressant au développement de lésions cérébrales dans d'autres pathologies touchant le SNC.

5 Références bibliographiques

1. Parachute. The Cost of Injury in Canada. Toronto; 2015.
2. Peitzman AB, Billiar TR. Current Problems in Surgery Hemorrhagic Shock. Crit Care. Mosby; 1995.
3. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. Injury. 2005;(36):691–709.
4. Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. Ann Intensive Care. 2012;2(1).
5. Maier B, Lefering R, Lehnert M, Laurer HL, Steudel WI, Neugebauer EA, et al. Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. Shock. 2007 Dec;28(6):668–74.
6. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. Nat Med. 2007 Jul;13(7):851–6.
7. Gilbert K, Rousseau G, Bouchard C, Dunberry-Poissant S, Baril F, Cardinal AM, et al. Caspase- (8/3) Activation and Organ Inflammation in a Rat Model of Resuscitated Hemorrhagic Shock. J Trauma Acute Care Surg. 2018;
8. Cairo MS. Recombinant urate oxidase (rasburicase): A new targeted therapy for prophylaxis and treatment of patients with hematologic malignancies at risk of tumor lysis syndrome. Vol. 3, Clinical Lymphoma. Cancer Information Group, LP; 2003. p. 233–4.
9. Standl T, Annecke T, Cascorbi I, Heller AR, Sabashnikov A, Teske W. The Nomenclature, Definition and Distinction of Types of Shock. Dtsch Arztebl Int. 2018 Nov 9;115(45):757–67.
10. Gutierrez G, Reines D, Wulf-Gutierrez M. Clinical Review: Hemorrhagic Shock. Crit Care. 2004;8:373–81.
11. Butcher NE, Balogh ZJ. Update on the definition of polytrauma. Eur J Trauma Emerg Surg. 2014;40(2):107–11.
12. Denk S, Weckbach S, Eisele P, Braun CK, Wiegner R, Ohmann JJ, et al. Role of Hemorrhagic Shock in Experimental Polytrauma. Shock. 2018 Feb 1;49(2):154–63.
13. Megevand B, Celi J, Niquille M. Hemorrhagic shock. Rev Med Suisse. 2014 Aug 13;10(438):1696–702.
14. Fröhlich S, Boylan J, Mcloughlin P. Hypoxia-induced inflammation in the lung: A potential therapeutic target in acute lung injury? Am J Respir Cell Mol Biol. 2013 Mar;48(3):271–9.
15. Deitch EA, Shi HP, Feketeova E, Hauser CJ, Xu D-Z. Hypertonic Saline Resuscitation limits Neutrophil activation after Trauma-Hemorrhagic Shock. Shock. 2003;19:328–33.
16. Moore K. The Physiological Response to Hemorrhagic Shock. J Emerg Nurs. 2014 Nov 18;40(6):629–31.
17. Mela-Riker L, Tavakoli H. Mitochondrial Function in Shock. Am J Emerg Med. 1984;2:2–7.

18. Lavric M, Miranda-García MA, Holzinger D, Foell D, Wittkowski H. Les alarmines attisent l'inflammation articulaire et sont prometteuses comme outil diagnostique et cibles thérapeutiques. *Rev du Rhum (Edition Fr)*. 2017;84:101–10.
19. Pelinka LE, Bahrami S, Szalay L, Umar F, Redl H. Hemorrhagic shock induces an S 100 B increase associated with shock severity. *Shock*. 2003 May;19(5):422–6.
20. Eser O, Kalkan E, Cosar M, Buyukbas S, Avunduk MC, Aslan A, et al. The effect of aprotinin on brain ischemic-reperfusion injury after hemorrhagic shock in rats: An experimental study. *J Trauma - Inj Infect Crit Care*. 2007 Aug;63(2):373–8.
21. Leung LY, Wei G, Shear DA, Tortella FC. The Acute Effects of Hemorrhagic Shock on Cerebral Blood Flow, Brain Tissue Oxygen Tension, and Spreading Depolarization following Penetrating Ballistic-Like Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2013 Mar 6;30(14):1288–98.
22. Meybohm P, Cavus E, Dörge V, Weber B, Stadlbauer KH, Wenzel V, et al. Release of protein S100B in haemorrhagic shock: Effects of small volume resuscitation combined with arginine vasopressin. *Resuscitation*. 2008;76:449–56.
23. Ayala A, Wang P, Chaudry I. Shock Models : Hemorrhage. In: *Surgical Research*. Academic Press; 2001.
24. Lewis SR, Pritchard MW, Evans DJW, Butler AR, Alderson P, Smith AF, et al. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill people. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Aug 3;8.
25. Skellett S, Mayer A, Durward A, Tibby SM, Murdoch IA. Chasing the base deficit: Hyperchloraemic acidosis following 0.9% saline fluid resuscitation. *Arch Dis Child*. 2000;83(6):514–6.
26. McClelland RN, Shires T, Baxter C, Coln D, Carrico J. Balanced Salt Solution in the Treatment of Hemorrhagic Shock. *JAMA*. 1967;199(11):830.
27. Saunders WB, Shires T, Coln D, Carrico J, Lightfoot S. Fluid Therapy in Hemorrhagic Shock. *Surg Induc Hear Block*. 1962;3:694–707.
28. Cohen DB, Magnotti LJ, Lu Q, Xu DZ, Berezina TL, Zaets SB, et al. Pancreatic duct ligation reduces lung injury following trauma and hemorrhagic shock. *Ann Surg*. 2004;240:885–91.
29. Junger WG, Rhind SG, Rizoli SB, Cuschieri J, Shiu MY, Baker AJ, et al. Resuscitation of traumatic hemorrhagic shock patients with hypertonic saline-without dextran-inhibits neutrophil and endothelial cell activation. *Shock*. 2012 Oct;38(4):341–50.
30. Zainal Abidin N, Haq IJ, Gardner AI, Brodlie M. Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Expert Opin Pharmacother*. 2017 Sep 2;18(13):1363–71.
31. Cossu AP, Mura P, De Giudici LM, Puddu D, Pasin L, Evangelista M, et al. Vasopressin in Hemorrhagic Shock: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Animal Trials. *Biomed Res Int*. 2014 Sep 1;2014:1–9.
32. Hylands M, Toma A, Beaudoin N, Frenette AJ, D'Aragon F, Belley-Côté É, et al. Early vasopressor use following traumatic injury: A systematic review. *BMJ Open*. 2017 Nov 1;7:1–11.
33. Dunberry-Poissant S, Gilbert K, Bouchard C, Baril F, Cardinal A-M, L'Ecuyer S, et al. Fluid

- sparing and norepinephrine use in a rat model of resuscitated haemorrhagic shock: end-organ impact. *Intensive Care Med Exp*. 2018 Dec;6(1).
34. Tonnus W, Meyer C, Paliege A, Belavgeni A, von Mässenhausen A, Bornstein SR, et al. The pathological features of regulated necrosis. *J Pathol*. 2019 Apr 1;247(5):697–707.
 35. Alonso DR, Scheidt S, Post M, Killip T, Alonso R. Pathophysiology of Cardiogenic Shock Quantification of Myocardial Necrosis, Clinical, Pathologic and Electrocardiographic Correlations. *Circulation*. 1973;XLVIII:588–96.
 36. Yang J, Klaidman LK, Chang ML, Kem S, Sugawara T, Chan P, et al. Nicotinamide therapy protects against both necrosis and apoptosis in a stroke model. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;73:901–10.
 37. Linkermann A, Bräsen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller JO, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 16;110(29):12024–9.
 38. Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis*. 2001;8(2):207–19.
 39. Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol*. 1972 Jun;67(3):417–40.
 40. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013 Jan 2;123(1):92–100.
 41. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Vol. 70, *British Medical Bulletin*. 2004. p. 71–86.
 42. Go KL, Lee S, Zendejas I, Behrns KE, Kim JS. Mitochondrial Dysfunction and Autophagy in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–14.
 43. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190:255–66.
 44. Heckbert SR, Md, Vedder NB, Hoffman W, Rn, Winn RK, et al. Outcome after Hemorrhagic Shock in Trauma Patients. *J Trauma Acute Care Surg*. 1998;45:545–9.
 45. Falkenberg L, Zeckey C, Mommsen P, Winkelmann M, Zelle BA, Panzica M, et al. Long-term outcome in 324 polytrauma patients: What factors are associated with posttraumatic stress disorder and depressive disorder symptoms? *Eur J Med Res*. 2017 Oct 30;22(1).
 46. Van Delft-Schreurs CCHM, Van Son MAC, De Jongh MAC, Lansink KWW, e Vries J, Verhofstad MHJ. The relationship between physical and psychological complaints and quality of life in severely injured patients. *Injury*. 2017;48:1978–84.
 47. Jan R, Goris A, Te Boekhorst TPA, Nuytinck JKS, Gimbrè JSF. Multiple-Organ Failure Generalized Autodestructive Inflammation? *Arch Surg*. 1985;120:1109–15.
 48. Marshall J. The multiple organ dysfunction syndrome. In: Zuckschwerdt, editor. *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. 2001.
 49. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994;81:631–41.
 50. Håkansson L, Nielsen LS, Teder P. Measurement of neutrophil and eosinophil adhesion to E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 by the use of transfected fibroblast cell lines. *J Immunol Methods*. 1994 Nov 10;176(1):53–66.

51. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159–75.
52. De Oliveira THC, Marques PE, Proost P, Teixeira MMM. Neutrophils: A cornerstone of liver ischemia and reperfusion injury. *Lab Investig*. 2018 Jan 1;98(1):51–62.
53. Kukiela GL, Hawkins HK, Michael L, Manning AM, Youker K, Lane C, et al. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest*. 1993;92(3):1504–16.
54. Sordi R, Chiazza F, Collino M, Assreuy J, Thiemermann C. Neuronal nitric oxide synthase is involved in vascular hyporeactivity and multiple organ dysfunction associated with hemorrhagic shock. *Shock*. 2016 May 1;45(5):525–33.
55. Tousoulis D, Kampoli A-M, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012 Jan;10(1):4–18.
56. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiol*. 2017 Jan 1;219(1):22–96.
57. Guan J, Jin D di, Jin L juan, Lu Q. Apoptosis in organs of rats in early stage after polytrauma combined with shock. *J Trauma*. 2002;52(1):104–11.
58. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: Dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*. 2017 Jan 1;14(1):43–64.
59. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol*. 2014;5.
60. Ahsan Ejaz A, Pourafshar N, Mohandas R, Smallwood BA, Johnson RJ, Hsu JW. Uric acid and the prediction models of tumor lysis syndrome in AML. *PLoS One*. 2015 Mar 16;10(3).
61. Cowsert Jr. MK, Carrier Jr. O, Crowell JW. The Effect of Hemorrhagic Shock on Blood Uric Acid Level. *Can J Physiol Pharmacol*. 2011 Apr 24;44(5):861–4.
62. Jones C, Crowell J, Smith E. Significance of increased blood uric acid following extensive hemorrhage. *Am J Physiol Content*. 2017 Dec 22;214(6):1374–7.
63. Kono H, Chen CJ, Ontiveros F, Rock KL. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J Clin Invest*. 2010 Jun 1;120(6):1939–49.
64. Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest*. 2006 Aug 1;116(8):2262–71.
65. Shi Y, Evans JE, Rock KL, Varshney GK, Deleuil F, Hallberg B, et al. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003 Oct 2;425:516–21.
66. Desideri G, Castaldo G, Lombardi A, Mussap M, Testa A, Pontremoli R, et al. Is it time to revise the normal range of serum uric acid levels? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18:1295–306.
67. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol*. 2016 Jun 15;213:8–14.
68. Martillo MA, Nazzari L, Crittenden DB. The crystallization of monosodium urate. *Curr Rheumatol Rep*. 2014 Feb;16(2).
69. Sakhaee K. Epidemiology and clinical pathophysiology of uric acid kidney stones. *J*

- Nephrol. 2014;27(3):241–5.
70. Crisan TO, Cleophas MCP, Oosting M, Lemmers H, Toenhake-Dijkstra H, Netea MG, et al. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Ann Rheum Dis*. 2016 Apr 1;75(4):755–62.
 71. Braga TT, Forni MF, Correa-Costa M, Ramos RN, Barbuto JA, Branco P, et al. Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. *Sci Rep*. 2017 Jan 13;7.
 72. Xiao J, Zhang XL, Fu C, Han R, Chen W, Lu Y, et al. Soluble uric acid increases NALP3 inflammasome and interleukin-1 β expression in human primary renal proximal tubule epithelial cells through the Toll-like receptor 4-mediated pathway. *Int J Mol Med*. 2015 May 1;35(5):1347–54.
 73. Valle M, Martos R, Cañete MD, Valle R, van Donkelaar EL, Bermudo F, et al. Association of serum uric acid levels to inflammation biomarkers and endothelial dysfunction in obese prepubertal children. *Pediatr Diabetes*. 2015 Sep 1;16(6):441–7.
 74. Mirrakhimov AE. Tumor lysis syndrome: A clinical review. *World J Crit Care Med*. 2015 Apr 15;4(2):130.
 75. Abu-Alfa AK, Younes A. Tumor lysis syndrome and acute kidney injury: Evaluation, prevention, and management. *Am J Kidney Dis*. 2010;55:S1–13.
 76. Oda M, Satta Y, Takenaka O, Takahata N. Loss of Urate Oxidase Activity in Hominoids and its Evolutionary Implications. *Mol Biol Evol*. 2002;19(5):640–53.
 77. Wu X, Muzny DM, Chi Lee C, Thomas Caskey C. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol*. 1992;34(1):78–84.
 78. Johnson RJ, Lanaspa MA, Gaucher EA. Uric Acid: A Danger Signal From the RNA World That May Have a Role in the Epidemic of Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiorenal Disease: Evolutionary Considerations. *Semin Nephrol*. 2011 Sep;31(5):394–9.
 79. Cairo MS, Thompson S, Tangirala K, Eaddy MT. A Clinical and Economic Comparison of Rasburicase and Allopurinol in the Treatment of Patients With Clinical or Laboratory Tumor Lysis Syndrome. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2017 Mar 1;17:173–8.
 80. Bove M, Cicero AFG, Borghi C. The Effect of Xanthine Oxidase Inhibitors on Blood Pressure and Renal Function. *Curr Hypertens Rep*. 2017 Dec 1;19(12).
 81. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2008;27:608–19.
 82. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Nov;78(11):6858–62.
 83. Wang YF, Li JX, Sun XS, Lai R, Sheng WL. High serum uric acid levels are a protective factor against unfavourable neurological functional outcome in patients with ischaemic stroke. *J Int Med Res*. 2018 May 1;46(5):1826–38.
 84. Shi J, Liu Y, Duan Y, Sun Z, Wang B, Meng R, et al. A new idea about reducing reperfusion injury in ischemic stroke: Gradual reperfusion. *Med Hypotheses*. 2013 Feb;80(2):134–6.
 85. Nour M, Scalzo F, Liebeskind DS. Ischemia-Reperfusion Injury in Stroke. *Interv Neurol*. 2013 Sep 11;1(3–4):185–99.
 86. Cornford EM, Oldendorf WH. Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors. *BBA - Biomembr*. 1975;394:211–9.

87. Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res.* 1998 Sep 1;53(5):613–25.
88. Weir CJ, Muir SW, Walters MR, Lees KR. Serum urate as an independent predictor of poor outcome and future vascular events after acute stroke. *Stroke.* 2003;34:1951–7.
89. Hooper DC, Bagasra O, Marini JC, Zborek A, Ohnishi ST, Kean R, et al. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 18;94(6):2528–33.
90. Bolton C, Wood EG, Scott GS, Flower RJ. A comparative evaluation of the response to peroxynitrite by a brain endothelial cell line and control of the effects by drug targeting. *Cell Mol Neurobiol.* 2009;29:707–17.
91. Kanbay M, Jensen T, Solak Y, Le M, Roncal-Jimenez C, Rivard C, et al. Uric acid in metabolic syndrome: From an innocent bystander to a central player. *Eur J Intern Med.* 2016 Apr 1;29:3–8.
92. Maples KR, Mason RP. Free radical metabolite of uric acid. *J Biol Chem.* 1988;263(4):1709–12.
93. Bagnati M, Perugini C, Cau C, Bordone R, Albano E, Bellomo G. When and why a water-soluble antioxidant becomes pro-oxidant during copper-induced low-density lipoprotein oxidation: a study using uric acid. *Biochem J.* 2015 Aug 10;340(1):143–52.
94. Ghaemi-Oskouie F, Shi Y. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* 2011;13:160–6.
95. Shi Y. Caught red-handed: Uric acid is an agent of inflammation. *J Clin Invest.* 2010;120:1809–11.
96. Wan X, Xu C, Lin Y, Lu C, Li D, Sang J, et al. Uric acid regulates hepatic steatosis and insulin resistance through the NLRP3 inflammasome-dependent mechanism. *J Hepatol.* 2016;
97. Gurung P, Kanneganti TD. Novel Roles for Caspase-8 in IL-1 β and Inflammasome Regulation. *Am J Pathol.* 2015;185:17–25.
98. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 2014;157:1013–22.
99. Man SM, Kanneganti TD. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:7–21.
100. Milanesi S, Verzola D, Cappadona F, Bonino B, Murugavel A, Pontremoli R, et al. Uric acid and angiotensin II additively promote inflammation and oxidative stress in human proximal tubule cells by activation of toll-like receptor 4. *J Cell Physiol.* 2019 Jul 1;234(7):10868–76.
101. Zhang J, Diao B, Lin X, Xu J, Tang F. TLR2 and TLR4 mediate an activation of adipose tissue renin-angiotensin system induced by uric acid. *Biochimie.* 2019;
102. Van Der Sluis CK, Eisma' WH, Groothoff JW, Ten Duis HJ. Long-term physical, psychological and social consequences of severe injuries. *Injury.* 1998;29(4):281–5.
103. Isaacson RL. Limbic System. In: *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences.* Springer; 2001. p. 8858–62.
104. Whyte EM, Mulsant BH. Post stroke depression: Epidemiology, pathophysiology, and

- biological treatment. In: *Biological Psychiatry*. 2002.
105. Kessler RC, Petukhova M, Sampson NA, Zaslavsky AM, Wittchen HU. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *Int J Methods Psychiatr Res*. 2012 Sep;21(3):169–84.
 106. Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Jun;16(6):317–31.
 107. Rasmussen S, Miller M, Filipisky S, Tolwani R. Cage Change Influences Serum Corticosterone and Anxiety-Like Behaviors in the Mouse. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011;50(4).
 108. Skórzewska A, Lehner M, Wiśłowska-Stanek A, Krzaścik P, Ziemba A, Płaźnik A. The effect of chronic administration of corticosterone on anxiety- and depression-like behavior and the expression of GABA-A receptor alpha-2 subunits in brain structures of low- and high-anxiety rats. *Horm Behav*. 2014 Jan;65(1):6–13.
 109. Lydiard RB. The role of GABA in anxiety disorders. Vol. 64, *Journal of Clinical Psychiatry*. 2003. p. 21–7.
 110. Truitt WA, Johnson PL, Dietrich AD, Fitz SD, Shekhar A. Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala. *Neuroscience*. 2009 May 5;160(2):284–94.
 111. Guadagno A, Wong TP, Walker C-D. Morphological and functional changes in the preweaning basolateral amygdala induced by early chronic stress associate with anxiety and fear behavior in adult male, but not female rats. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2018;81:25–37.
 112. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):46–56.
 113. Li M, Li C, Yu H, Cai X, Shen X, Sun X, et al. Lentivirus-mediated interleukin-1 β (IL-1 β) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice. *J Neuroinflammation*. 2017 Sep 20;14(1).
 114. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal Profile of Neuronal Damage in a Model of Transient Forebrain Ischemia. *Ann Neurol*. 1982;11:491–8.
 115. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 1982 May 6;239(1):57–69.
 116. Benatti C, Blom JMC, Rigillo G, Alboni S, Zizzi F, Torta R, et al. Disease-Induced Neuroinflammation and Depression. *CNS Neurol Disord Targets*. 2016;15:414–33.
 117. Karimi S, Jahanshahi M, Golalipour MJ, Jahanshahi M. The Effect of MDMA-Induced Anxiety on Neuronal Apoptosis in Adult Male Rats' Hippocampus. *Folia Biol*. 2014;60:187–91.
 118. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2012;122:1164–71.
 119. Zimmer D 6, Cornwall EH, Iandar A, Song W. The SIOO Protein Family: History, Function, and Expression. *Brain Res Bull*. 1995;37(4):417–29.
 120. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-

- 2000)*. *Neurochem Res.* 2000;25(9):1439–51.
121. Haim L Ben, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzériat K, Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015 Aug 3;9.
 122. Quintana FJ. Astrocytes to the rescue! Glia limitans astrocytic endfeet control CNS inflammation. Vol. 127, *Journal of Clinical Investigation.* American Society for Clinical Investigation; 2017. p. 2897–9.
 123. Di Giovanni S, Movsesyan V, Ahmed F, Cernak I, Schinelli S, Stoica B, et al. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci.* 2005 Jun 7;102(23):8333–8.
 124. Huang L, Wu ZB, ZhuGe Q, Zheng WM, Shao B, Wang B, et al. Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke. *Int J Med Sci.* 2014 Feb 11;11(4):344–8.
 125. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997 Dec;20(12):570–7.
 126. Toulmond S, Parnet P, Linthorst ACE. When cytokines get on your nerves: Cytokine networks and CNS pathologies. *Trends Neurosci.* 1996;19(10):409–10.
 127. Efremova L, Chovancova P, Adam M, Gutbier S, Schildknecht S, Leist M. Switching from astrocytic neuroprotection to neurodegeneration by cytokine stimulation. *Arch Toxicol.* 2017 Jan 1;91(1):231–46.
 128. Robinson C, Apgar C, Shapiro LA. Astrocyte Hypertrophy Contributes to Aberrant Neurogenesis after Traumatic Brain Injury. *Neural Plast.* 2016;2016.
 129. Goshen I, Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2009 Jan;30(1):30–45.
 130. Saijo K, Crotti A, Glass CK. Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia.* 2013 Jan;61(1):104–11.
 131. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:441–68.
 132. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res.* 1995;57:1–9.
 133. Wang H, Song G, Chuang H, Chiu C, Abdelmaksoud A, Ye Y, et al. Portrait of glial scar in neurological diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2018;31:1–6.
 134. Kivrak T, Balin M, Kobalt A, Aytac E, Karaca I. Role of Neutrophils in the Inflammation of Brain. *SM Atheroscler J.* 2017;1:1002.
 135. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7.
 136. Ferrari CC, Depino AM, Prada F, Muraro N, Campbell S, Podhajcer O, et al. Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. *Am J Pathol.* 2004;165:1827–37.
 137. Allen C, Thornton P, Denes A, McColl BW, Pierozynski A, Monestier M, et al. Neutrophil Cerebrovascular Transmigration Triggers Rapid Neurotoxicity through Release of Proteases Associated with Decondensed DNA. *J Immunol.* 2012 Jul 1;189(1):381–92.
 138. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease. *Am J Med.* 1999;107:489–506.
 139. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell.* 2009;138:838–54.

140. Poreba M, Strózyk A, Salvesen GS, Drag M. Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5.
141. Jia SH, Parodo J, Charbonney E, Tsang JLY, Jia SY, Rotstein OD, et al. Activated neutrophils induce epithelial cell apoptosis through oxidant-dependent tyrosine dephosphorylation of caspase-8. *Am J Pathol.* 2014;184:1030–40.
142. Verzola D, Ratto E, Villaggio B, Parodi EL, Pontremoli R, Garibotto G, et al. Uric acid promotes apoptosis in human proximal tubule cells by oxidative stress and the activation of NADPH oxidase NOX 4. *PLoS One.* 2014;
143. Kovach AGB, Sandor P. Cerebral Blood Flow and Brain Function During Hypotension and Shock. *Annu Rev Physiol.* 2003 Jul 2;38(1):571–96.
144. Hu Y, Wang Z, Pan S, Zhang H, Fang M, Jiang H, et al. Melatonin protects against blood-brain barrier damage by inhibiting the TLR4/ NF- κ B signaling pathway after LPS treatment in neonatal rats. *Oncotarget.* 2017;8:31638–54.
145. Vogt N, Herden C, Roeb E, Roderfeld M, Eschbach D, Steinfeldt T, et al. Cerebral Alterations Following Experimental Multiple Trauma and Hemorrhagic Shock. *SHOCK.* 2018;49:164–73.
146. Mccarron RM, Yu Z-Y, Ono S, Spatz M. Effect of Hemorrhagic Shock on Apoptosis and Energy-Dependent Efflux System in the Brain. *Neurochem Res.* 2002;27(12):1625–32.
147. El Falougy H, Kubikova E, Benuska J. The microscopical structure of the hippocampus in the rat. *Bratisl Lek List.* 2008;109(3):106–10.
148. Kudo Y, Ohtaki H, Dohi K, Yin L, Nakamachi T, Endo S, et al. Neuronal damage in rat brain and spinal cord after cardiac arrest and massive hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 2006 Nov;34(11):2820–6.
149. Blanchette M, Daneman R. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev.* 2015;138:8–16.
150. Betz AL, Firth JA, Goldstein GW. Polarity of the blood-brain barrier: Distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* 1980;192:17–28.
151. Lécuyer M-AA, Kebir H, Prat A. Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking. 2016 Mar 1;1862(3):472–82.
152. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia.* 2013 Dec;61(12):1939–58.
153. Chow BW, Gu C. The Molecular Constituents of the Blood-Brain Barrier. *Trends in Neurosciences.* 2015.
154. Worzfeld T, Schwaninger M. Apicobasal polarity of brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Feb 1;36(2):340–62.
155. McCaffrey G, Staatz WD, Quigley CA, Nametz N, Seelbach MJ, Campos CR, et al. Tight junctions contain oligomeric protein assembly critical for maintaining blood-brain barrier integrity in vivo. *J Neurochem.* 2007 Dec;103(6):2540–55.
156. Brown RC, Davis TP. Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Feb 25;327(4):1114–23.
157. Coomber BL, Stewart PA. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res.* 1985;30:99–115.

158. Malik AB, Lynch JJ, Cooper JA. Endothelial barrier function. *J Invest Dermatol.* 1989;93:62S-67S.
159. Zhang H, Park JH, Maharjan S, Park JA, Choi KS, Park H, et al. Sac-1004, a vascular leakage blocker, reduces cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing blood-brain barrier disruption and inflammation. *J Neuroinflammation.* 2017;
160. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2000;
161. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic B V. Central nervous system pericytes in health and disease. Vol. 14, *Nature Neuroscience.* 2011. p. 1398–405.
162. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010 Nov 25;468(7323):557–61.
163. Hamm S, Dehouck B, Kraus J, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Risau W, et al. Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res.* 2004 Feb;315(2):157–66.
164. Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. Vol. 128, *Journal of Neuroimmunology.* Elsevier; 2002. p. 58–68.
165. Wong D, Dorovini-Zis K. Regulation by cytokines and lipopolysaccharide of E-selectin expression by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55(2):225–35.
166. Marlin' SD, Springer TA. PutMed Intercellular Adhesion de-1 (CAM-I) Is a Ligand for Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 (LFA-1). *Cell.* 1987;51:813–9.
167. Li P, Zhang L, Zhang M, Zhou C, Lin N. Uric acid enhances PKC-dependent eNOS phosphorylation and mediates cellular ER stress: A mechanism for uric acid-induced endothelial dysfunction. *Int J Mol Med.* 2016;37:989–97.
168. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int.* 2005;67:1739–42.
169. Cai W, Duan X-M, Liu Y, Yu J, Tang Y-L, Liu Z-L, et al. Uric Acid Induces Endothelial Dysfunction by Activating the HMGB1/RAGE Signaling Pathway. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–11.
170. Liang WYY, Zhu XYY, Zhang JWW, Feng XRR, Wang YCC, Liu MLL. Uric acid promotes chemokine and adhesion molecule production in vascular endothelium via nuclear factor-kappa B signaling. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25(2):187–94.
171. Mark KS, Davis TP. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2015 Mar 3;282(4):H1485–94.
172. Yen LF, Wei VC, Kuo EY, Lai TW. Distinct Patterns of Cerebral Extravasation by Evans Blue and Sodium Fluorescein in Rats. *PLoS One.* 2013 Jul 5;8(7):1–9.
173. Jiao H, Wang Z, Liu Y, Wang P, Xue Y. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *J Mol Neurosci.* 2011;44:130–9.
174. Krizbai IA, Lenzser G, Szatmari E, Farkas AE, Wilhelm I, Fekete Z, et al. Blood-brain barrier changes during compensated and decompensated hemorrhagic shock. *Shock.* 2005

- Nov;24(5):428–33.
175. Dekker SE, Sillesen M, Bambakidis T, Jin G, Liu B, Boer C, et al. Normal saline influences coagulation and endothelial function after traumatic brain injury and hemorrhagic shock in pigs. *Surg (United States)*. 2014;156:556–63.
 176. Gasse P, Riteau N, Vacher R, Michel ML, Fautrel A, di Padova F, et al. IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. *PLoS One*. 2011;6:1–12.
 177. Kanbay M, Segal M, Afsar B, Kang DH, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ. The role of uric acid in the pathogenesis of human cardiovascular disease. *Heart*. 2013 Jun;99(11):759–66.
 178. Wu AH, Gladden JD, Ahmed M, Ahmed A, Filippatos G. Relation of serum uric acid to cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2016;213:4–7.
 179. Gaubert M, Marlinge M, Alessandrini M, Laine M, Bonello L, Fromonot J, et al. Uric acid levels are associated with endothelial dysfunction and severity of coronary atherosclerosis during a first episode of acute coronary syndrome. *Purinergic Signal*. 2018 Jun 1;14(2):191–9.
 180. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int*. 2005;67:1739–42.
 181. Lu W, Xu Y, Shao XX, Gao F, Li Y, Hu J, et al. Uric Acid Produces an Inflammatory Response through Activation of NF- κ B in the Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Metabolic Disorders. *Sci Rep*. 2015;5:1–15.
 182. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982;78(3):206–9.
 183. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14:149–67.
 184. Khazoom F, L'Ecuyer S, Gilbert K, Gagné M-A, Bouchard C, Rose CF, et al. Uric acid impact on liver injury and intestinal permeability after resuscitated hemorrhagic shock in a rat model. 2020;
 185. Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res*. 1998;53:613–25.
 186. Pelinka LE, Jafarmadar M, Redl H, Bahrami S. Neuron-specific-enolase is increased in plasma after hemorrhagic shock and after bilateral femur fracture without traumatic brain injury in the rat. *Shock*. 2004;22:88–91.
 187. Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol*. 1984 Sep;62(3):201–8.
 188. Kuppusamy P, Ohnishi ST, Numagami Y, Ohnishi T, Zweier JL. Three-dimensional imaging of nitric oxide production in the rat brain subjected to ischemia-hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15(6):899–903.
 189. Malick M, Gilbert K, Brouillette J, Godbout R, Rousseau G. Cognitive deficits following a post-myocardial infarct in the rat are blocked by the serotonin-norepinephrine reuptake

- inhibitor desvenlafaxine. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 1;19(12).
190. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic B V. Clearance of amyloid- β peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Targets*. 2009;8:16–30.
 191. Olmedo-Díaz S, Estévez-Silva H, Orädd G, af Bjerkén S, Marcellino D, Virel A. An altered blood–brain barrier contributes to brain iron accumulation and neuroinflammation in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2017 Oct 24;362:141–51.
 192. Bogush M, Heldt NA, Persidsky Y. Blood Brain Barrier Injury in Diabetes: Unrecognized Effects on Brain and Cognition. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017 Dec 1;12(4):593–601.
 193. Zhang H, Park JH, Maharjan S, Park JA, Choi KS, Park H, et al. Sac-1004, a vascular leakage blocker, reduces cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing blood-brain barrier disruption and inflammation. *J Neuroinflammation*. 2017;14:1–15.
 194. Zehendner CM, Librizzi L, de Curtis M, Kuhlmann CRW, Luhmann HJ. Caspase-3 contributes to ZO-1 and Cl-5 Tight-junction disruption in rapid anoxic neurovascular unit damage. *PLoS One*. 2011;6:1–11.
 195. Nikolian VC, Dekker SE, Bambakidis T, Higgins GA, Dennahy IS, Georgoff PE, et al. Improvement of Blood-Brain Barrier Integrity in Traumatic Brain Injury and Hemorrhagic Shock Following Treatment with Valproic Acid and Fresh Frozen Plasma. *Crit Care Med*. 2018;46:e59–66.
 196. Brillault J, Berezowski V, Cecchelli R, Dehouck MP. Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem*. 2002 Nov;83(4):807–17.
 197. Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*. 2009 Mar 10;4(3):1–8.
 198. Maclean PD. The limbic system (“visceral brain”) and emotional behavior. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1955;73:130–4.
 199. Kuipers MT, Aslami H, Vlaar APJ, Juffermans NP, Tuij-de Boer AM, Hegeman MA, et al. Pre-Treatment with Allopurinol or Uricase Attenuates Barrier Dysfunction but Not Inflammation during Murine Ventilator-Induced Lung Injury. *PLoS One*. 2012;7:1–11.
 200. Schultz V, Lowenstein JM. Purine Nucleotide Cycle Evidence for the Occurrence of the Cycle in Brain. *J Biol Chem*. 1976;251(2):485–92.
 201. Kinuta Y, Kimura M, Kikuchi H. Changes in xanthine oxidase in ischemic rat brain. *J Neurosurg*. 1989;71:417–20.
 202. Kanemitsu H, Tamura A, Sano K, Iwamoto T, Yoshiura M, Iriyama K. Changes of Uric Acid Level in Rat Brain After Focal Ischemia. *J Neurochem*. 1986;46:851–3.
 203. Kang D-H, Park S-K, Lee I-K, Johnson RJ. Uric Acid-Induced C-Reactive Protein Expression: Implication on Cell Proliferation and Nitric Oxide Production of Human Vascular Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Dec;16(12):3553–62.
 204. Vannorsdall TD, Jinnah HA, Gordon B, Kraut M, Schretlen DJ. Cerebral ischemia mediates the effect of serum uric acid on cognitive function. *Stroke*. 2008;34:18–20.
 205. Lin T, Koustova E, Chen H, Rhee PM, Kirkpatrick J, Alam HB, et al. Energy substrate-supplemented resuscitation affects brain monocarboxylate transporter levels and gliosis in a rat model of hemorrhagic shock. *J Trauma - Inj Infect Crit Care*. 2005

- Nov;59(5):1191–202.
206. Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, et al. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Induces Barrier Function of Endothelial Cells Forming the Blood-Brain Barrier. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261:108–12.
 207. Abbott NJ, Revest PA, Romero IA. Glial Symposium Astrocyte-endothelial interaction: physiology and pathology. *Neuropathology Appl Neurobiol Appl Neurobiol*. 1992;18:424–33.
 208. Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochem Res*. 2009;44:2067–77.
 209. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. *Stroke*. 2001;32:1208–15.
 210. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res*. 1999 Nov 18;117(2):145–52.
 211. Gustin A, Kirchmeyer M, Koncina E, Felten P, Losciuto S, Heurtaux T, et al. NLRP3 inflammasome is expressed and functional in mouse brain microglia but not in astrocytes. *PLoS One*. 2015 Jun 19;10(6).
 212. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. 2010;140:821–32.
 213. Johnson KM, Crocker SJ. TIMP-1 couples RhoK activation to IL-1 β -induced astrocyte responses. *Neurosci Lett*. 2015 Nov 16;609:165–70.
 214. Stroemer RP, Rothwell NJ. Exacerbation of Ischemic Brain Damage by Localized Striatal Injection of Interleukin-1 β in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Nov 18;18(8):833–9.
 215. Mega MS, Cummings JL, Salloway S, Malloy P. The limbic system: an anatomic, phylogenetic, and clinical perspective. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1997;9(3):315–30.
 216. Kovach AGB. The function of the central nervous system after Haemorrhage. *J Clin Pathol*. 1970;S3-4(1):202–12.
 217. Llull L, Amaro S, Chamorro Á. Administration of Uric Acid in the Emergency Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016;16:1–11.
 218. Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res*. 2005;1035:24–31.
 219. Rothwell N, Allan S, Toulmond S. Perspectives Series: Cytokines and The Brain The Role of Interleukin 1 in Acute Neurodegeneration and Stroke: Pathophysiological and Therapeutic Implications. *J Clin Invest*. 1997;100(11):2648–52.
 220. Friedlander RM, Gagliardini V, Rotello RJ, Yuan J. Functional role of interleukin 1 β (IL-1 β) in IL-1 β -converting enzyme- mediated apoptosis. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):717–24.
 221. Verzola D, Ratto E, Villaggio B, Parodi EL, Pontremoli R, Garibotto G, et al. Uric acid promotes apoptosis in human proximal tubule cells by oxidative stress and the activation of NADPH oxidase NOX 4. *PLoS One*. 2014 Dec 16;9(12):1–19.
 222. Song C, Zhao X. Uric acid promotes oxidative stress and enhances vascular endothelial cell apoptosis in rats with middle cerebral artery occlusion. *Biosci Rep*. 2018 May 15;38(3).

223. Wakabayashi C, Numakawa T, Odaka H, Ooshima Y, Kiyama Y, Manabe T, et al. IL-1 receptor-antagonist (IL-1Ra) knockout mice show anxiety-like behavior by aging. *Neurosci Lett*. 2015;599:20–5.
224. Goddard G V. Functions of the Amygdala. *Psychological Bulletin*. 1964;62(2):89–109.
225. Babaev O, Piletti Chatain C, Krueger-Burg D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. Vol. 50, *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group; 2018.
226. Reinhoud NJ, Brouwer HJ, Van Heerwaarden LM, Korte-Bouws GAH. Analysis of glutamate, GABA, noradrenaline, dopamine, serotonin, and metabolites using microbore UHPLC with electrochemical detection. *ACS Chem Neurosci*. 2013 May 15;4(5):888–94.
227. Eichenbaum H. Memory: Organization and Control. *Annu Rev Psychol*. 2017 Jan 3;68(1):19–45.
228. Cohen SJ, Stackman RW. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res*. 2015;285:105–17.
229. Eagle A, Wang H, Robison A. Sensitive Assessment of Hippocampal Learning Using Temporally Dissociated Passive Avoidance Task. *BIO-PROTOCOL*. 2016;6(11).
230. Cha J, Greenberg T, Song I, Blair Simpson H, Posner J, Mujica-Parodi LR. Abnormal hippocampal structure and function in clinical anxiety and comorbid depression. *Hippocampus*. 2016 May 1;26(5):545–53.
231. Raper J, Wilson M, Sanchez M, Payne C, Bachevalier J. Increased anxiety-like behaviors, but blunted cortisol stress response after neonatal hippocampal lesions in monkeys. *Psychoneuroendocrinology*. 2017 Feb 1;76:57–66.
232. Levy BH, Tasker JG. Synaptic regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress. *Front Cell Neurosci*. 2012 May 11;6:1–13.
233. Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996;54:21–30.
234. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21:801–10.
235. Abelaira HM, Reúus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013;35(SUPPL.2).
236. Friedman E, Berman M, Overstreet D. Swim test immobility in a genetic rat model of depression is modified by maternal environment: A cross-foster study. *Dev Psychobiol*. 2006 Mar;48(2):169–77.
237. Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29:547–69.
238. File SE, Hyde JRG. Can Social Interaction be Used to Measure Anxiety? *Br J Pharmacol*. 1978;62(1):19–24.
239. File SE. The use of Social Interaction as as Method for Detecting Anxiolytic activity of Chlordiazepoxide-like Drugs. *J Neurosci Methods*. 1980;2:219.
240. Vahid-Ansari F, Lagace DC, Albert PR. Persistent post-stroke depression in mice following unilateral medial prefrontal cortical stroke. *Transl Psychiatry*. 2016 Aug 2;6(8).
241. Saucier DM, Yager JY, Armstrong EA. Housing environment and sex affect behavioral

- recovery from ischemic brain damage. *Behav Brain Res*. 2010;214:48–54.
242. Boyko M, Azab AN, Kuts R, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Melamed I, et al. The neuro-behavioral profile in rats after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*. 2013;1491:109–16.
 243. Fava M, Rankin MA, Wright EC, Alpert JE, Nierenberg AA, Pava J, et al. Anxiety disorders in major depression. *Compr Psychiatry*. 2000;41:97–102.
 244. Fréchou M, Margail I, Marchand-Leroux C, Beray-Berthat V. Behavioral tests that reveal long-term deficits after permanent focal cerebral ischemia in mouse. *Behav Brain Res*. 2019;360:69–80.
 245. Detke MJ, Rickels M, Lucki I, Rickels M, Detke MJ. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995;121:66–72.
 246. Castagné V, Porsolt RD, Moser P. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *Eur J Pharmacol*. 2009;616:128–33.
 247. Chandley M, Ordway G. Noradrenergic Dysfunction in Depression and Suicide. In: *The Neurobiological Basis of Suicide*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis; 2012.
 248. Maletic V, Eramo A, Gwin K, Offord SJ, Duffy RA. The role of norepinephrine and its α -adrenergic receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder and schizophrenia: A systematic Review. *Front Psychiatry*. 2017 Mar 17;8:1–12.
 249. Mineur YS, Cahuzac EL, Mose TN, Bentham MP, Plantenga ME, Thompson DC, et al. Interaction between noradrenergic and cholinergic signaling in amygdala regulates anxiety- and depression-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2018 Sep 1;43(10):2118–25.
 250. Gilbert K, Bernier J, Godbout R, Rousseau G. Resolvin D1, a metabolite of omega-3 polyunsaturated fatty acid, decreases post-myocardial infarct depression. *Mar Drugs*. 2014 Nov 13;12(11):5396–407.
 251. Strekalova T, Evans M, Costa-Nunes J, Bachurin S, Yeritsyan N, Couch Y, et al. Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. *Brain Behav Immun*. 2015;
 252. del Mar Romero M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of sex and prior exposure to a cafeteria diet on the distribution of sex hormones between plasma and blood cells. *PLoS One*. 2012 Mar 27;7(3).
 253. Vogel WH, Jensh R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosci Lett*. 1988;87:183–8.